

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURI ALVES JUNIOR

OXIDAÇÃO E SULFATAÇÃO DE ULVANAS DE *Ulva fasciata*: ATIVIDADE  
ANTICOAGULANTE E PROPRIEDADES MACROMOLECULARES

CURITIBA  
2019

LAURI ALVES JUNIOR

OXIDAÇÃO E SULFATAÇÃO DE ULVANAS DE *Ulva fasciata*: ATIVIDADE  
ANTICOAGULANTE E PROPRIEDADES MACROMOLECULARES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA  
2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas. Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Alves Junior, Lauri

Oxidação e sulfatação de ulvanas de *Ulva fasciata*: Atividade anticoagulante e propriedades macromoleculares. / Lauri Alves Junior. – Curitiba, 2019.  
106 p.: il.

Orientador: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientador: Miguel Daniel Nosedá

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Clorófitas 2. Estrutura química 3. Anticoagulantes 4. Oxidação 5. Polissacarídeos I. Título II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte III. Nosedá, Miguel Daniel IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LAURI ALVES JUNIOR** intitulada: **OXIDAÇÃO E SULFATAÇÃO DE ULVANAS DE *Ulva Fasciata*: ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E PROPRIEDADES MACROMOLECULARES**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Abril de 2019.

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDÁ  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA  
Avaliador Externo (UFPR)

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI  
Avaliador Interno (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá, pela dedicada orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Miguel D. Nosedá, pelas contribuições e ensinamentos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Aos professores da banca Prof. Dr. Diogo R.B. Ducatti e Profa. Dra. Sandra M. W. Barreira, pelas correções e sugestões ao trabalho durante a arguição

Ao professor Prof. Dr. Diogo R.B. Ducatti por toda ajuda e pelas sugestões.

À técnica, Elisângela e Keilla pelas análises de HPSEC-RI-MALLS,

Ao Centro de RMN- UFPR pelas análises de RMN.

Ao CETFAR (Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos) da Universidade Federal de Santa Maria, pela doação do plasma utilizado nos testes anticoagulantes.

Aos colegas de laboratório E3 e 248 por toda ajuda, troca de ideias e amizade: Guilherme, Paul, Luísa, André, Tati, Diego e todos os demais colegas que passaram por estes laboratórios ao longo do mestrado.

À Dra. Mariana M. de Carvalho e à Dra. Jaqueline Carneiro pela paciência, e por todo o apoio e carinho e pelas discussões de resultados, trocas de ideias e sugestões.

À Dra. Ester Mazepa e Dra. Juliana C. Dallagnol pelo auxílio nas reações de sulfatação, pelas discussões de resultados e sugestões.

Aos colegas dos laboratórios 269 e 318.

À CAPES pela concessão de bolsa. Às demais agências de fomento e projetos que financiaram este trabalho: CNPQ, Fundação Araucária e Projeto Universal.

Aos meus pais e meus padrinhos pelo incentivo. Aos demais familiares e amigos.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção e a caracterização de ulvanas sulfatadas via oxidação, redução e sulfatação sequenciais e avaliação da atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas dos polímeros nativos e modificados quimicamente. A ulvana nativa F2 foi oxidada com  $\text{NaIO}_4$  por 24, 48 e 72 horas, sequencialmente reduzida com  $\text{NaBH}_4$  e sulfatada originando as frações P1r-S, P2r-S e P3r-S, respectivamente ( $\text{SO}_3^- = 43,4 - 51\%$ ). Adicionalmente a fração nativa F2 foi sulfatada originando a fração F2-S. A fração nativa F2 e seus produtos modificados quimicamente foram analisadas por HPSEC-RI-MALLS. Após a modificação química houve redução nos valores de massa molar média ponderada ( $M_w$ ) em até 6 vezes. A avaliação da atividade anticoagulante *in vitro* através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) mostrou que as ulvanas oxidadas, reduzidas e sulfatadas apresentaram atividade anticoagulante superior em relação a fração nativa na seguinte ordem: F2-S ~ P1r-S > P2r-S > P3r-S. As ulvanas sulfatadas quimicamente apresentaram uma baixa variação nos tempos de protrombina (PT) e uma alta variação nos testes de trombina (TT) em relação à salina. Estes resultados sugerem que as ulvanas sulfatadas atuam na via intrínseca da cascata de coagulação com possível interação direta ou indireta na trombina. As frações com maior atividade anticoagulante foram F2-S e P1r-S que apresentaram maior DS (1,8 e 1,9) quando comparadas com P2r-S e P3r-S (1,4). A atividade anticoagulante foi atribuída a um aumento de cargas negativas (grupo O-sulfato), como também ao fato de que o polímero adota uma conformação aleatória em solução, como avaliado pelas análises de dicroísmo circular. Desse modo, a modificação química das ulvanas via oxidação, redução e sulfatação originou ulvanas com diferentes teores de grupos O-sulfato com potencial aplicação como novos agentes anticoagulantes.

Palavras-chave: Algas verdes. Ulvanas. Estrutura química. Oxidação. Sulfatação. Atividade anticoagulante. Propriedades físico-químicas.



## ABSTRACT

The aim of this study was to obtain and characterize sulfated ulvans via oxidation, reduction and sulfation reactions, in addition to the evaluation of the anticoagulant activity and physico-chemical properties of the chemically modified and native polymers. Native ulvan F2 was oxidized with  $\text{NaIO}_4$  for 24, 48 and 72 hours and sequentially reduced with  $\text{NaBH}_4$  and sulfated to yield the fractions P1r-S, P2r-S and P3r-S, respectively ( $\text{SO}_3^- = 43.4 - 51\%$ ). Moreover, the sulfation of the native fraction F2 originated the fraction F2-S. Fraction F2 and its chemically modified products were analyzed by HPSEC-RI-MALLS. After the chemical modification there was a reduction in the values of weight average molar mass ( $M_w$ ) up to six times. *In vitro* evaluation of the anticoagulant activity, through activated partial thromboplastin time test (APTT), showed that the oxidized, reduced and sulfated ulvans present superior anticoagulant activity when compared to the native fraction in the following order: F2-S ~ P1r-S > P2r-S > P3r-S. Chemically sulfated ulvans showed low variation in prothrombin time (PT) and a high variation in the thrombin (TT) test when compared to saline solution. These results suggest that sulfated ulvans act in the intrinsic pathway of the coagulation cascade with possible direct or indirect interaction in thrombin. The fractions with higher anticoagulant activity were F2-S and P1r-S, which presented higher DS (1,8 and 1,9) when compared to P2r-S and P3r-S (1,4). The anticoagulant activity was attributed to the increase of negative charges (O-sulfate group), as well as to the fact that the polymer adopts a random conformation in solution, as evaluated by circular dichroism analyzes. Therefore, the chemical modifications of ulvans via oxidation, reduction and sulfation reactions gave rise to different levels of O-sulfate groups with potential application as new anticoagulant drugs

Keywords: Green algae. Ulvans. Chemical structure. Oxidation. Sulfation. Anticoagulant activity. Physico-chemical properties.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DÍADES PRESENTES EM ULVANAS.....	20
FIGURA 2 - MECANISMO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM PERIODATO.....	24
FIGURA 3 - UNIDADES DE GLUCOSE OXIDADAS COM PERIODATO: 1→2 (A), 1→4 (B), 1→6 (C) e 1→3 (D). ....	25
FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE HEMIACETAIS EM ALGINATO APÓS OXIDAÇÃO COM PERIODATO .....	26
FIGURA 5 - VIA CLÁSSICA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	31
FIGURA 6 - ESTRUTURA REPETITIVA DA HEPARINA.....	33
FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DISSACARÍDICA REPETITIVA PRESENTE NAS CARRAGENANAS (A) ESTRUTURA GERAL DAS CARRAGENANAS DA FAMÍLIA KAPPA E LAMBDA (B).....	34
FIGURA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE RAO DE GIRO E RAO HIDRODINÂMICO ..	37
FIGURA 9 - EXEMPLAR DE <i>Ulva fasciata</i> .....	41
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>U. fasciata</i> .....	43
FIGURA 11 - MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS DE <i>U. fasciata</i> REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO .....	44
FIGURA 12 - EXEMPLO DE UMA DÍADE DE ULVANA PASSÍVEL DE OXIDAÇÃO COM NaIO <sub>4</sub> .....	52
FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D) .....	55
FIGURA 14 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) E P3 (D) .....	56
FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C (REGIÃO DE 110-85 PPM) DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D) .....	57
FIGURA 16 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 110-88 PPM E 5,5-4,5 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C).....	58
FIGURA 17 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 88-55 PPM E 5,0-3,0 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C).....	59
FIGURA 18 - REDUÇÃO COM NaBH <sub>4</sub> DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS DERIVADOS DE ULVANAS OBTIDOS APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO <sub>4</sub> .....	61



FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO P1 ANTES (A) E APÓS A REDUÇÃO COM $\text{NaBH}_4$ (B).....	63
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO P2 ANTES (A) E APÓS REDUÇÃO COM $\text{NaBH}_4$ (B).....	64
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO P3 ANTES (A) E APÓS REDUÇÃO COM $\text{NaBH}_4$ (B).....	65
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P1r.....	66
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P2r.....	67
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P3r.....	68
FIGURA 25 - SULFATAÇÃO DOS DERIVADOS DE ULVANAS OBTIDOS APÓS REDUÇÃO COM $\text{NaBH}_4$ .....	71
FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES P1r (A) E P1r-S (B)...	75
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES P2r (A) E P2r-S (B)...	76
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES P3r (A) E P3r-S (B)...	77
FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P1r-S.....	78
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P2r-S.....	79
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P3r-S.....	80
FIGURA 32 - GRÁFICO DO APTT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLÍMERO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, F2-SR, P1r-S, P2r-S P3r-S e P1r-SR) .....	85
FIGURA 33 - GRÁFICO DO TT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLÍMERO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S ).....	88
FIGURA 34 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	91
FIGURA 35 - VARREDURAS (197 – 250 nm) DO ESPECTRO DE CD EM NaCl 0,9% A 37°C .....	93

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DA FRAÇÃO F2.....	51
TABELA 2 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2, P1, P2 E P3.....	53
TABELA 3 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1, P2 E P3.....	60
TABELA 4 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES P1r, P2r E P3r E DE SUAS FRAÇÕES DE ORIGEM P1, P2 E P3.....	62
TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1r, P2r E P3r.....	70
TABELA 6 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES P1r-S, P2r-S e P3r-S E DE SUAS FRAÇÕES DE ORIGEM P1r, P2r e P3r .....	72
TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1R-S, P2R-S E P3R-S.....	81
TABELA 8 - TESTE DE APTT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	83
TABELA 9 - TESTE DE APTT PARA A HEPARINA.....	83
TABELA 10 - EQUAÇÃO DA RETA, CN <sub>2</sub> APTT, E $\Delta T \cdot \mu g^{-1}$ DE POLISSACARÍDEO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, P1R-S, P2R-S E P3R-S).....	85
TABELA 11 - TESTE DE PT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	87
TABELA 12 - TESTE DE PT PARA A HEPARINA.....	87
TABELA 13 - TESTE DE TT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	87
TABELA 14 - TESTE DE TT PARA A HEPARINA.....	87
TABELA 15 - EQUAÇÃO DA RETA, CN <sub>2</sub> TT, E $\Delta T \cdot \mu g^{-1}$ DE POLISSACARÍDEO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S) .....	89
TABELA 16 - MASSA MOLAR MÉDIA PONDERADA E DN/DC DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta T$  – Variação de tempo

APTT – tempo de tromboplastina parcial ativada

CN2APTT – concentração necessária para dobrar o valor normal do APTT

CN2TT – Concentração necessária para dobrar o valor normal de TT

$dn/dc$  – variação do índice de refração em relação a concentração

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier

HCII – cofator II da heparina

HMBC – *heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*

HMWK – cininogênio de alta massa molar

HSQC – *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*

HPSEC – cromatografia de

LMMH – heparina de baixa massa molar

MALLS – *multi-angle laser light scattering*

$M_w$  – massa molar média ponderal

PT – tempo de protrombina

RI – Índice de refração

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN  $^1H$  – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN  $^{13}C$  – ressonância magnética nuclear de carbono treze

TFA – ácido trifluoracético

TFPI – inibidor da via do fator tissular

TT – tempo de trombina

UFH – (heparina não fracionada)

F2 – Ulvina nativa.

F2-S – Ulvina nativa após sulfatação.

F2-SR – Fração obtida a partir da carboxiredução de F2-S

P1, P2 e P3 – Frações obtidas após a oxidação de F2 com periodato de sódio nos tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente.

P1r, P2r e P3r – Frações obtidas a partir da redução de P1, P2 e P3, respectivamente.

P1r-S, P2r-S e P3r-S – Frações obtidas a partir da sulfatação de P1r, P2r e P3r, respectivamente.

P1r-SR – Fração obtida a partir da carboxiredução de P1r-S.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 JUSTIFICATIVA.....	17
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivo geral.....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 POLISSACARÍDEOS BIOSINTETIZADOS POR MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES.....	19
2.1.1 Estrutura química de ulvanas.....	19
2.1.2 Atividades biológicas de ulvanas.....	21
2.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	22
2.2.1 Oxidação com periodato de sódio.....	23
2.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS VIA OXIDAÇÃO COM PERIODATO E REDUÇÃO COM $\text{NaBH}_4$ .....	28
2.4 SULFATAÇÃO.....	29
2.5 HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO.....	30
2.5.1 Heparina.....	32
2.6 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS.....	33
2.7 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	36
2.7.1 RAIO DE GIRO E RAIO HIDRODINÂMICO.....	37
2.7.2 COMPRIMENTO DE PERSISTÊNCIA.....	38
2.7.3 VISCOSIDADE.....	38
2.8 DICROISMO CIRCULAR.....	39
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DA ESPÉCIE ESTUDADA.....	41
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO.....	42
3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA <i>ULVA FASCIATA</i> .....	42
3.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS ULVANAS.....	43
3.3.1 Oxidação com <i>meta</i> -periodato de sódio.....	45
3.3.2 Redução com borohidreto de sódio.....	45

3.3.3 Sulfatação .....	45
3.3.4 Carboxi-redução das frações F2-S e P1r-S.....	46
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS .....	46
3.4.1 Determinação do teor de carboidratos.....	46
3.4.2 Determinação do teor de proteínas.....	46
3.4.2 Determinação de grupos sulfato .....	47
3.4.3 Dosagem de ácidos urônicos.....	47
3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	47
3.6 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i> .....	48
3.6.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) .....	48
3.6.2 Tempo de protrombina (PT) .....	48
3.6.3 Tempo de trombina (TT).....	49
3.7 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO DE ALTO DESEMPENHO (HPSEC).....	49
3.8 DICROÍSMO CIRCULAR.....	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS ULVANAS NATIVAS....	50
4.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO F2 .....	52
4.3 OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO F2 COM <i>META</i> -PERIODATO DE SÓDIO.....	52
4.3.1 Rendimento, análises químicas e espectroscópicas das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3.....	52
4.3.2 Análise de RMN das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3.....	53
4.4 REDUÇÃO DAS FRAÇÕES P1, P2 E P3 COM BORIDRETO DE SÓDIO ..	61
4.4.1 Análises químicas das ulvanas dialdeídicas reduzidas P1r, P2r E P3r ....	61
4.4.2 Análise de RMN das ulvanas dialdeídicas após redução com NaBH <sub>4</sub> .....	62
4.5 SULFATAÇÃO DE ULVANAS DIALDEÍDICAS REDUZIDAS P1R, P2R E P3R .....	71
4.5.1 Análises químicas das ulvanas dialdeídicas reduzidas e sulfatadas P1r-S, P2r-S e P3r-S.....	71
4.5.2 Análises de RMN das ulvanas dialdeídicas reduzidas e sulfatadas P1r-S, P2r-S e P3r-S.....	73
4.6 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS ULVANAS NATIVAS E MODIFICADAS .....	82

4.6.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) para ulvanas nativas (F2) e seus produtos modificados.....	83
4.6.2 Teste de tempo de protrombina (PT) para ulvanas nativas e modificadas ...	86
4.6.3 Teste de tempo de trombina (TT) para as ulvanas nativas e modificadas.	87
4.7 PROPRIEDADES MACROMOLECULARES DAS ULVANAS NATIVAS E DE SEUS PRODUTOS OBTIDOS APÓS A SULFATAÇÃO .....	90
4.7.1 Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alto Desempenho (HPSEC-RI-MALLS).....	90
4.8 ANÁLISES DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	92
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>95</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Macroalgas verdes do gênero *Ulva* constituem uma fonte renovável e de baixo custo para obtenção compostos bioativos, dentre os quais se destacam os polissacarídeos sulfatados denominados ulvanas, os quais apresentam propriedades biológicas e físico-químicas de interesse farmacêutico e biotecnológico (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; FREITAS et al., 2015; CARVALHO et al., 2018). Tais polímeros possuem como principal constituinte o ácido ulvanobiurônico, dissacarídeo formado por:  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-}\text{ácido glucurônico-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose 3-sulfato-(1}\rightarrow ]$ .

Ulvanas apresentam diversas atividades biológicas, dentre as quais a atividade anticoagulante. Porém poucos estudos comprovam a atividade anticoagulante das mesmas (MAO et al., 2006; WANG et al., 2013).

Atualmente o agente anticoagulante utilizada na clínica médica é a heparina. Porém, seu uso vem sendo relacionado com efeitos adversos, como por exemplo, hemorragia, trombocitopenia, além casos de contaminação viral devido a sua origem animal. Sendo assim, torna-se necessária a busca de novos compostos com atividade anticoagulante (MESTECHKINA; SMESTECHKINA, 2010).

Modificações químicas como a proposta neste trabalho podem ser utilizadas com o objetivo de potencializar as propriedades anticoagulantes apresentadas por ulvanas. Adicionalmente podem ainda elucidar mecanismos de ação de uma mesma molécula, e ainda permitir a identificação das subestruturas chaves necessárias para cada atividade.

Para diversos polissacarídeos foi relatado que atividade anticoagulante é dependente da massa molar além presença de grupos sulfato em posições específicas, podendo variar de acordo com o tipo de polissacarídeo. (POMIN; MOURÃO, 2008; ARAÚJO et al., 2013). A sulfatação química aumenta a atividade anticoagulante das ulvanas, o que já foi demonstrado para estes polímeros (WANG et al., 2013).

Com a finalidade de observar o efeito do aumento do teor de grupos sulfato na atividade anticoagulante, no presente trabalho, ulvanas de *Ulva fasciata* foram submetidas ao processo de modificação química sequencial via oxidação, redução e



sulfatação. Para este fim, foi escolhida a oxidação com periodato de sódio onde o íon periodato oxida hidroxilas vicinais e leva à ruptura da ligação carbono-carbono, formando dois grupos aldeído em cada uma das unidades oxidadas. Estes grupos aldeído são reduzidos a álcoois primários com borohidreto de sódio, os quais são passíveis de sulfatação (GOLDSTEIN et al., 1965; ARAUJO et al., 2013).

Para as ulvanas, a oxidação redução e sulfatação pode originar um produto com alto caráter aniônico, devido ao aumento do teor de grupos sulfato. Diante disso, este trabalho tem como objetivo oxidar, reduzir e sulfatar ulvanas e avaliar o efeito desta modificação na atividade anticoagulante e nas propriedades físico-químicas destes polímeros.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Ulvanas, polissacarídeos obtidos de macroalgas verdes do gênero *Ulva*, são uma potencial fonte para obtenção de compostos bioativos com aplicação biomédica, como a atividade anticoagulante. A modificação química oxidação seguida de sulfatação química de ulvanas, proposta neste trabalho, é inédita para este tipo de polissacarídeo sulfatado. Análises dessas alterações e a avaliação da atividade anticoagulante ainda são pouco descritas para ulvanas quimicamente modificadas. Destaca-se também que o mecanismo de ação de ulvanas para atividade anticoagulante ainda não foi totalmente elucidado. O estudo em conjunto das propriedades biológicas e físico-químicas pode ser uma ferramenta útil na elucidação dos possíveis mecanismos de ação de ulvanas na cascata de coagulação e de como as modificações químicas podem alterar as interações entre o polissacarídeo e as proteínas envolvidas nesse processo.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Obtenção de novas moléculas, modificadas via oxidação, redução e sulfatação, com potencial atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas diferentes do polímero original.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Modificar ulvanas quimicamente através de reações de oxidação com periodato de sódio, seguida de redução e sulfatação;
- Caracterizar química e espectroscopicamente a ulvana nativa e seus produtos modificados quimicamente;
- Avaliar a atividade anticoagulante in vitro da ulvana nativa e de seus produtos modificados quimicamente;
- Avaliar propriedades físico-químicas da ulvana nativa e de seus produtos modificados quimicamente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POLISSACARÍDEOS BIOSINTETIZADOS POR MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES

#### 2.1.1 Estrutura química de ulvanas

Em estudos pioneiros, Brading e colaboradores (1954) mostraram que polissacarídeos biossintetizados pela alga verde *Ulva lactuca* são polímeros constituídos por unidades de D-xilose, L-ramnose, D-glucose e ácido D-glucurônico. Foi observada também a presença de grupos sulfato ( $R-O-SO_3Na$ ), entretanto, devido à complexidade da estrutura, não foi possível determinar a posição dos grupos sulfato na estrutura do polissacarídeo. Somente foi sugerido que eles deveriam estar ligados à glucose ou ramnose (Brading et al. 1954). Este também foi um dos primeiros estudos a identificar unidades de ramnose como sendo parte de um polissacarídeo de algas (Alves; Sousa; Reis, 2013).

Diferentes extratos obtidos de macroalgas verdes dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* foram caracterizados e comparados entre si. Apesar de diferentes pesquisadores utilizarem diversas metodologias de extração de polissacarídeos, eles chegaram a conclusões semelhantes e concordaram que o polissacarídeo solúvel em meio aquoso é composto por diversos açúcares como xilose, glucose, ácido urônico e ramnose sulfatada (AbdelFattah; Edrees, 1972; Brading et al. 1954; Gosselin et al. 1964; Lahaye; Axelos 1993; McKinnell; Percival 1962a, b; Percival; Wold 1963; Ray; Lahaye 1995b). Esses polímeros receberam a designação “ulvanas” por Lahaye e Axelos (1993). Ainda foram identificados como constituintes da estrutura de ulvanas unidades de ácido idurônico (Quemener et al. 1997).

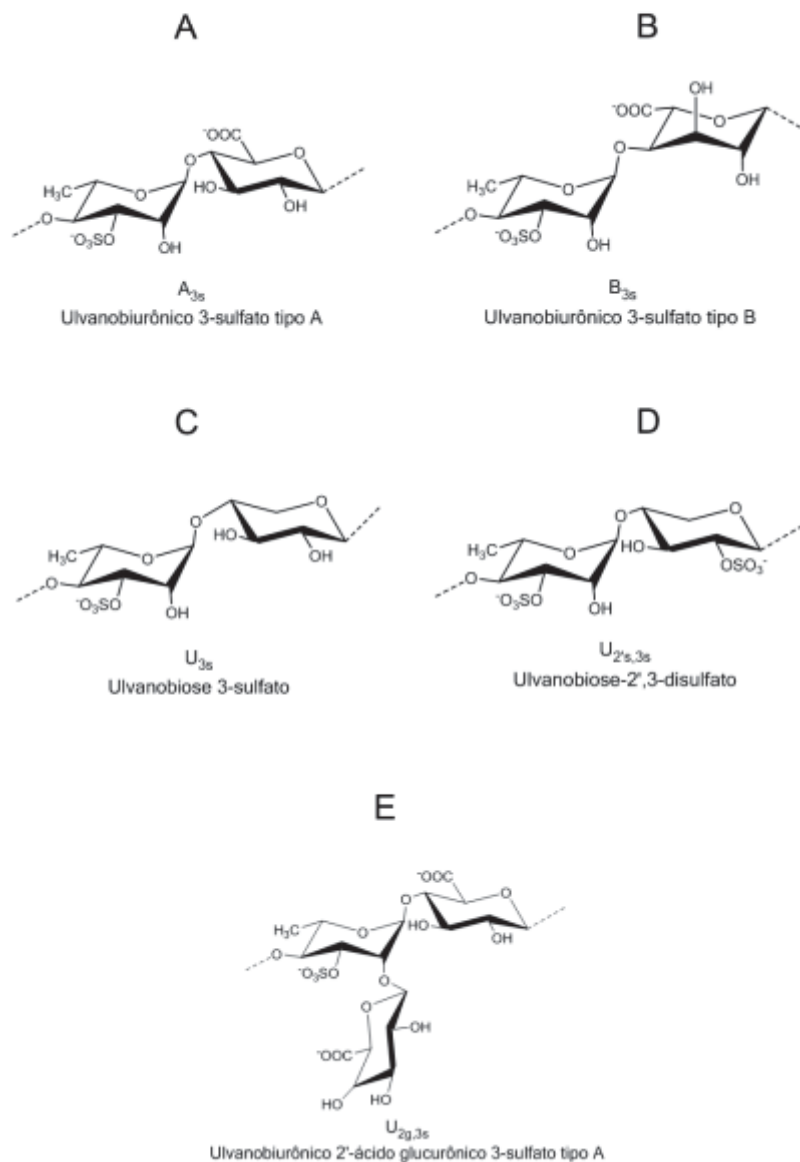
Estudos mais aprofundados definiram que as ulvanas são compostas por unidades de  $\alpha$ -L-ramnose,  $\beta$ -D-xilose e ácido  $\beta$ -D-glucurônico. Ulvanas são constituídas majoritariamente pela díade do ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A ( $A_{3S}$ ):  $[\rightarrow 4)\beta\text{-D-GlcAp}(1\rightarrow 4)\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato}(1\rightarrow ]$  (BRADING et al., 1954; MCKINNELL et al., 1962b; HAQ et al., 1966; LAHAYE et al., 1993).

O ácido idurônico em algumas espécies constitui a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo B ( $B_{3S}$ ):  $[\rightarrow 4)\alpha\text{-L-IdoAp}(1\rightarrow 4)\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato}(1\rightarrow ]$ .

Unidades de  $\beta$ -D-xilose constituem a díade de ulvanbiose 3-sulfato ( $U_{3s}$ ):  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(1}\rightarrow ]$ . (LAHAYE et al, 1997; QUEMENER et al., 1997 ROBIC et al., 2009;).

Quando a xilose encontra-se sulfatada em C-2 essa díade recebe o nome de ulvanbiose 2',3-dissulfato ( $U_{2's,3s}$ ):  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp 2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(1}\rightarrow ]$ . (LAHAYE et al., 1998; ROBIC et al., 2009). Adicionalmente unidades de ramnose podem estar ramificadas em C-2 por unidades de ácido  $\beta$ -D-glucurônico originando o ácido ulvanobiurônico 2'ácido glucurônico 3-sulfato tipo A ( $A_{2g,3s}$ ):  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-glucurônico-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose 3-sulfato-(2}\rightarrow 1)\text{-}\beta\text{-D-glucurônico}]$  (LAHAYE et al., 1998; ROBIC et al., 2009).

FIGURA 1 - DÍADES PRESENTES EM ULVANAS



Fonte: O autor, 2019

### 2.1.2 Atividades biológicas de ulvanas

Por apresentarem características estruturais peculiares, tais como caráter iônico (presença de grupos sulfato e carboxila) e certo caráter hidrofóbico devido à presença de desoxiaçúcar ( $\alpha$ -L-ramnose) em domínios específicos da cadeia polissacarídica, ulvanas apresentam potencial para obtenção de diversos produtos modificados de interesse biomédico e biotecnológico, mostrando-se uma fonte de biomassa com potencial para a produção de compostos bioativos (GLASSON et al., 2017).

A presença e o teor de grupos sulfato, dentre outros fatores estruturais apresentados por ulvanas, têm sido correlacionados por diversos grupos de pesquisa com as diferentes atividades biológicas apresentadas por estes polímeros. Ulvanas de *U. lactuca* apresentaram citotoxicidade contra três linhagens celulares de carcinoma humano incluindo carcinoma hepatocelular HepG2 ( $IC_{50}$   $29,67 \pm 2,87 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), câncer da mama humano MCF7 ( $IC_{50}$   $25,09 \pm 1,36 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) e câncer do colo do útero Hela ( $IC_{50}$   $36,33 \pm 3,84 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Estes polímeros apresentaram teores variáveis de ramnose, galactose, xilose, manose, glucose e ácido urônico de 21,5%, com teor de sulfato de 18,9% (THANH et al., 2016).

Ulvanas sulfatadas também apresentam potencial na promoção de atividades antioxidantes e anti-hiperlipidêmicas. Ulvanas de *U. pertusa* foram testadas *in vivo* quanto a atividade antioxidante no fígado de ratos hiperlipidêmicos. Nesse estudo, três ulvanas purificadas foram obtidas por cromatografia com DEAE-Sepharose. A maior atividade antioxidante detectada pelo modelo de camundongos Kunming hiperlipidêmicos, foi para a ulvana que possuía o maior teor de ácido urônico (24,09%) e teor de sulfato (23,99%), bem como menor massa molar ( $83 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ ). O maior teor de sulfato aumenta a atividade antioxidante *in vivo* (LI et al., 2018).

Ulvanas possuem potencial aplicação na terapia anticoagulante. Ulvanas de *U. globata* fracionadas por cromatografia de troca aniônica com diferentes graus de sulfatação (23,0 a 35,2 %), apresentaram atividade anticoagulante pelo teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). A fração com maior teor de grupos sulfato (35,2 %) apresentou um tempo de APTT de 250 segundos na concentração de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (tempo normal da coagulação sanguínea de 40,2 s). Para a fração com menor teor de sulfato (23,04 %), o tempo de APTT de 250 s foi alcançado na

concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (MAO *et al.*, 2006). O aumento no teor dos grupos sulfato foi, então, relacionado com a atividade anticoagulante de ulvanas de *U. conglobata*. Entretanto a atividade anticoagulante destas ulvanas foi menor quando comparada com a heparina, o fármaco de escolha na clínica médica para distúrbios da hemostasia (MAO *et al.*, 2006).

Ulvanas de *U. intestinalis* apresentaram atividade imunoestimulante através de testes *in vitro* utilizando linhagem de macrófagos de murino Raw 264.7. Esses polissacarídeos foram fracionados usando coluna de DEAE Sepharose, obtendo-se as frações heterogêneas formadas por monossacarídeos neutros (58,7-74,7%), sulfatados (6,2-24,5%), ácidos urônicos (4,9-5,9%) e proteínas (3,2-10,4%). Os monossacarídeos constituintes dessas frações foram a ramnose, glucose, galactose, xilose e arabinose. A massa molar ( $M_w$ ) dos polissacarídeos heterogêneos e fracionados variou de  $87,1 \times 10^3$  a  $194,1 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ . Os polissacarídeos heterogêneos não apresentaram toxicidade na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para as células Raw 264.7 e as frações induziam a proliferação celular. Um das frações de menor massa molecular estimulou proliferação celular a partir da concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e a maior atividade imunoestimulatória foi relacionada a sua menor massa molecular (TABARSA *et al.*, 2017).

## 2.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS

Para a obtenção de novos materiais com potencial bioatividade, polissacarídeos têm sido submetidos à modificações químicas, por apresentarem grupos funcionais como hidroxilas primárias, secundárias e grupos carboxila, suscetíveis a modificações químicas. As modificações químicas podem alterar a massa molecular de um polissacarídeo, bem como alterar suas propriedades físico-químicas, além de potencializar as atividades biológicas como a anticoagulante, antiviral e antitumoral (COSTE *et al.* 2015; QI; SHENG, 2015).

Modificações químicas têm sido investigadas intensivamente para o desenvolvimento de novos biomateriais com inovadoras propriedades físico-químicas. Dentre os materiais já utilizados para esta finalidade está a celulose, que é o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza, obtido de plantas e bactérias e formado por unidades de  $\beta$ -D-glucose 4-ligadas. Diversos materiais são obtidos a

partir de celulose, como a metilcelulose e a carboximetilcelulose que apresentam propriedades únicas, como a gelificação térmica. Esta propriedade, juntamente com propriedades de formação de filme são aplicadas na indústria alimentícia no seu uso como agente emulsificante e em formulações cosméticas e farmacêuticas (NASATO et al., 2015).

Derivados de alginato oxidados com periodato de sódio têm recebido atenção de vários grupos de pesquisa (Arlov et al. 2015; Pawar, 2017; Venkatesan et al. 2014). A oxidação com periodato promove o surgimento de grupos mais reativos (aldeídos), o que promove uma degradação mais rápida do polímero. Por este motivo este material pode ser usado como suporte para administração controlada de fármacos. Em alginatos, a oxidação ocorre em C2 e C3 das unidades de ácido  $\alpha$ -L-GluAp e do ácido  $\beta$ -D-ManAp. Os derivados oxidados de alginato têm sido amplamente utilizados em uma variedade pesquisas para aplicações biomédicas, incluindo a engenharia de tecidos. Hidrogéis obtidos a partir de derivados quimicamente modificados de alginato apresentam uma melhor taxa degradação, o que melhora a formação de tecido semelhante à cartilagem *in vivo*, em comparação com os hidrogéis de alginato (BOUHADIR et al. ,2001; VENKATESAN et al. 2014 ).

Entre as principais estratégias de modificação de polissacarídeos a sulfatação química é a mais frequente. A introdução de grupos sulfatos pode alterar as características estruturais do polissacarídeo e aumentar significativamente a atividade biológica, devido à introdução de cargas negativas em hidroxilas primárias e secundárias, originando um polieletrólito com potencial aplicação como análogo da heparina (ARLOV et al.,2014). A sulfatação química também pode promover o aumento na solubilidade em meio aquoso e potencializar a atividade antitumoral de polissacarídeos (ZHANG et al.,2015).

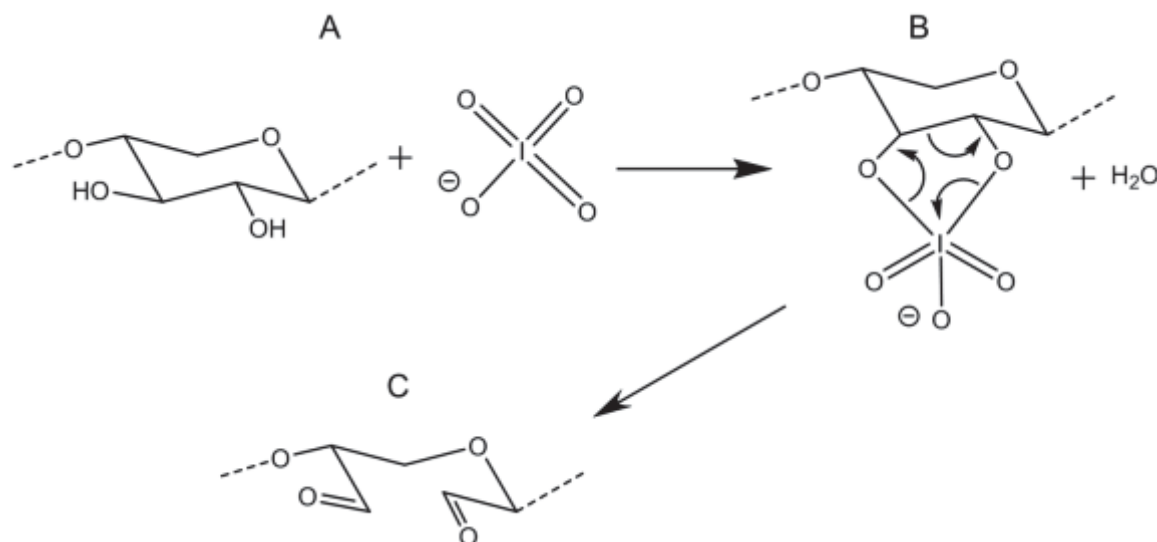
### 2.2.1 Oxidação com periodato de sódio

A oxidação com periodato é uma reação clássica na química de carboidratos utilizada para determinação de carbonos com grupos hidroxila vicinais. O íon periodato ( $\text{IO}_4^-$ ) promove a clivagem oxidativa de hidroxilas vicinais, o que acarreta na ruptura das ligações carbono-carbono, com consequente formação de dois grupos aldeídos nas unidades oxidadas (GOLDSTEIN et al., 1965; PERLIN, 2006). O



mecanismo de oxidação inclui a formação de um intermediário na forma de um éster de periodato cíclico e, finalmente, a decomposição do éster nos produtos oxidados (figura 2).

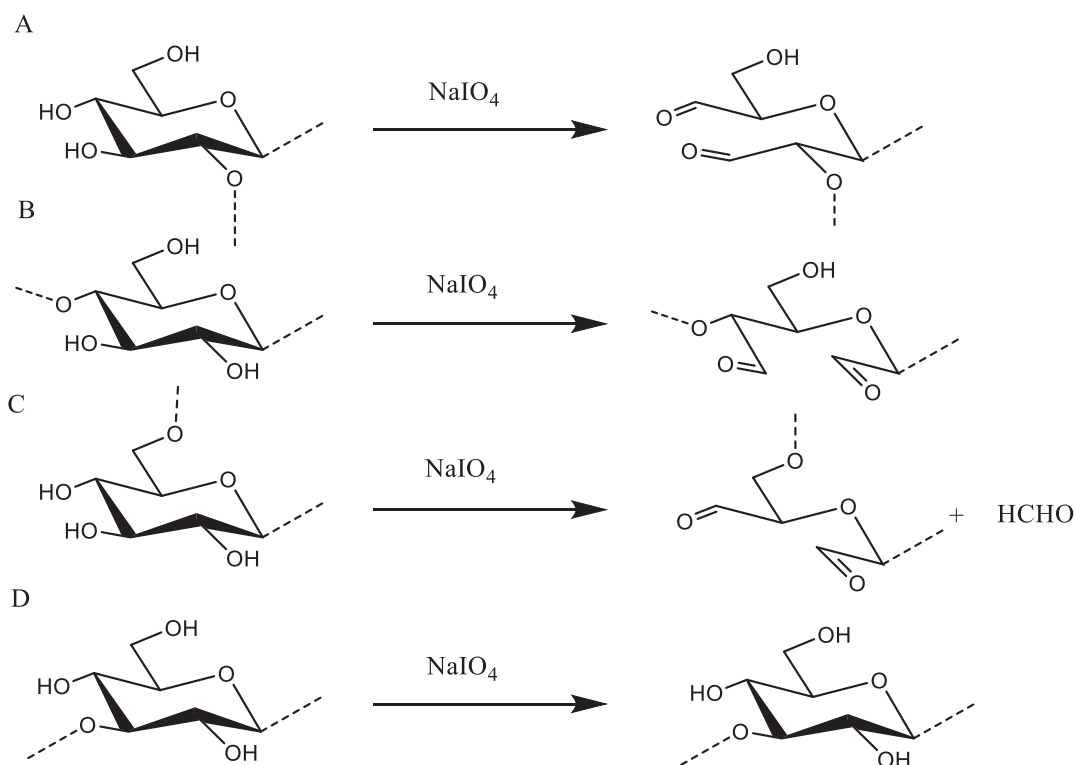
FIGURA 2 - MECANISMO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM PERIODATO



FONTE: O autor, 2019.

Dada a especificidade da reação de oxidação com periodato, que só ocorre na presença de hidroxilas vicinais (figura 2A), a oxidação de polissacarídeos é dependente do tipo de ligação das unidades monossacarídicas, ocorrendo nas unidades 1→2, 1→4, e 1→6 ligadas, enquanto em unidades 1→3 ligadas não ocorre oxidação (figura 3D). Para que ocorra a oxidação, ainda é necessário que os grupos hidroxila presentes no monossacarídeo estejam orientados nas posições equatorial-equatorial ou axial-equatorial, sendo que as hidroxilas vicinais em posição axial-axial apresentam maior rigidez, não havendo assim a formação do complexo intermediário (figura 2B) necessário para que a oxidação com periodato ocorra (KRISTIANSEN et al., 2010). Na figura 3 estão representados exemplos de produtos obtidos na oxidação com periodato da glucose em diferentes tipos de ligações glicosídicas.

FIGURA 3 - UNIDADES DE GLUCOSE OXIDADAS COM PERIODATO: 1→2 (A), 1→4 (B), 1→6 (C) e 1→3 (D).



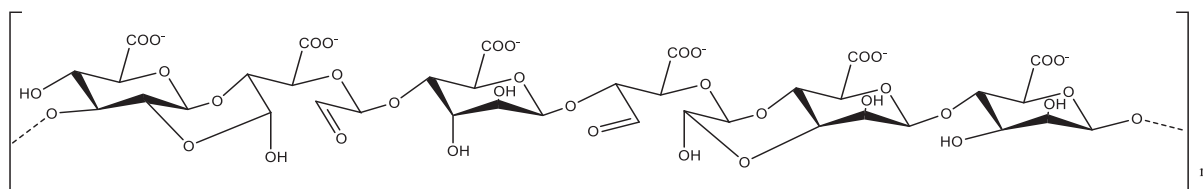
FONTE: O autor, 2019.

Nesta reação os aldeídos em solução reagem com água e entram em equilíbrio rapidamente. O produto gerado é um diol geminal, também chamado de hidrato, formado pela reação de adição nucleofílica a compostos carbonílicos, formando dióis. A água é adicionada a carbonila, o hidrogênio se liga-se ao oxigênio carbonílico (nucleofílico) e a hidroxila ao carbono carregado positivamente, ocorrendo tanto em meio ácido quanto em meio básico. O meio ácido torna o carbono da carbonila mais eletrofílico, enquanto que o meio básico torna o oxigênio da água mais nucleofílico (CAREY, 2011).

Os grupos aldeído formados após a oxidação com periodato formam espontaneamente anéis hemiacetais com a hidroxila mais próxima da unidade vizinha não oxidada. Essa reação intramolecular ocorre através de um mecanismo de adição nucleofílica ao carbono da carbonila com o grupo hidroxila de uma unidade não oxidada, formando hemiacetais cíclicos de seis membros, pois os hemiacetais cíclicos são mais estáveis quando comparados com hemiacetais não cíclicos. Em meio neutro há baixa de formação de hemiacetais, podendo aumentar quando em meio ácido ou

básico. A figura 4 ilustra a representação geral do mecanismo de reação da formação de hemiacetais (LARSEN; PAINTER, 1969; PAINTER; LARSEN 1970; SMIDSRØD; PAINTER 1973).

FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE HEMIACEAIS EM ALGINATO APÓS OXIDAÇÃO COM PERIODATO



FONTE: O autor, 2019.

Quando o polissacarídeo está na sua forma de dialdeído, pode ocorrer a formação de um hemiacetal intramolecular entre os grupos de dialdeído e os grupos hidroxila das unidades vizinhas não oxidadas. Estudos de Larsen e Painter (1969) evidenciaram a formação de hemiacetais após a oxidação com periodato em alginatos. Ao realizarem a oxidação de alginatos observaram um limite de oxidação entre 44-55%, apesar de serem constituídos por unidades monossacarídicas 4-ligadas. Ao reduzir com  $\text{NaBH}_4$  e re-oxidar com  $\text{NaIO}_4$ , a oxidação chegou próximo a 100 %. A baixa oxidação foi atribuída a formação de hemiacetais na primeira etapa de oxidação (LARSEN; PAINTER, 1969, PAINTER; LARSEN, 1970).

Análises de metilação realizadas por Pazur e Forseberg (1977) em produtos de oxidação obtidos a partir de heteroglucanas foram realizadas para identificar derivados mono e di-metilados. O surgimento destes derivados foi atribuído ao grupo hidroxila de unidades não oxidadas em ligação com o aldeído da unidade oxidada. Quando os grupos aldeído são reduzidos com  $\text{NaBH}_4$  não ocorre a formação dos hemiacetais entre os grupos aldeído e a hidroxila das unidades não oxidadas. Há relatos da formação de hemiacetais após a oxidação com periodato em xilanas, mananas e dextranas (KRISTIANSEN et al., 2010).

Esta modificação tem sido aplicada vários tipos polissacarídeos como alginatos, mananas, xilanas e celulose. A oxidação com *m*-periodato destes polissacarídeos provoca a abertura do anel e leva à formação de estruturas flexíveis, semiflexíveis ou rígidas, bem como altera as propriedades físico-químicas como, massa molar e viscosidade intrínseca (KRISTIANSEN et al., 2010).

Outro fator que influencia as alterações nas propriedades físico-químicas é a despolimerização que pode ocorrer durante a oxidação. Essa despolimerização ocorre em muitos casos como em alginatos e quitosanas. Por sua vez, a despolimerização pode ocorrer por duas rotas principais, onde na primeira as extremidades redutoras expostas consomem periodato adicional, levando à "superoxidação", e a segunda degradação causada pelos radicais livres formados pela decomposição espontânea dos íons periodato em solução, que ocasionam a degradação, inclusive em baixas temperaturas, em abrigo de luz e com adição de antioxidantes (VOLD; CHRISTENSEN, 2005; SCOTT; PAGE THOMAS, 1976).

Os novos produtos originados da oxidação com periodato de polissacarídeos podem apresentar propriedades físico-químicas alteradas em relação ao polímero original. Diversos estudos sugerem que estes derivados podem ser utilizados em diferentes aplicações nas áreas biomédicas e biotecnológicas (KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010).

As atividades biológicas, antioxidante e antibacteriana foram descritas recentemente para derivados aldeídos obtidos de celulose microcristalina. A oxidação de periodato na celulose promoveu alterações nas propriedades físico-químicas ocasionadas pela abertura do anel, além de uma melhora nas atividades biológicas. Portanto, o estudo sugere uma possível relação na melhora das atividades biológicas a partir de modificações nas propriedades físico-químicas, como cristalinidade e estabilidade térmica (ZHANG et al, 2017).

Derivados de alginatos dialdeídos, obtidos pela oxidação com periodato foram oxidados em temperatura ambiente durante 24 h em solução aquosa. A oxidação ocasionou a diminuição da rigidez do polímero ao clivar as ligações C2-C3 com a simultânea formação de grupos aldeído. Os derivados que apresentavam um oxidação maior que 10% não formavam géis com íons cálcio e esse comportamento foi atribuído à diminuição das interações cooperativas entre o íons cálcio e grupos carboxila devido a redução da massa molar (GOMEZ; RINAUDO; VILLAR, 2007).

## 2.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS VIA OXIDAÇÃO COM PERIODATO E REDUÇÃO COM $\text{NaBH}_4$

Novos polímeros são originados pela oxidação de polissacarídeos com periodato, gerando grupos aldeído, os quais podem ser funcionalizados com diferentes grupos químicos como carboxila e amino. Estes grupos aldeído também podem ser reduzidos borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), originando um novo polímero com maior teor de hidroxilas primárias.

As heparinas de baixa massa molecular (LMMHs), obtidas por despolimerização química ou enzimática da heparina, são amplamente utilizadas como drogas antitrombóticas. A oxidação com periodato seguida da redução com borohidreto converte a heparina em seus derivados denominados *glycol-split* (gs), estes derivados são obtidos com a finalidade de reduzir os riscos de sangramento em usos não anticoagulantes / não antitrombóticos de heparinas (ALEKSEEVA et al., 2013)

As LMMHs exibem potente atividade anticoagulante através de seus efeitos sobre a trombina e o fator Xa. Esses agentes também são eficazes na liberação do inibidor da via do fator tecidual endotelial (TFPI), o inibidor natural do fator tecidual, e exibem efeitos antimetastáticos significativos *in vivo* (ALEKSEEVA et al., 2013; CASU; NAGGI; TORRI, 2015; MOUSA et al., 2006). No entanto, devido ao potencial para complicações hemorrágicas, não é recomendada a terapia de pacientes com câncer.

Estudos com a forma não anticoagulante de heparina de baixa massa molar (NA-LMMH), também conhecida como *glycol-split* (gs), obtida por oxidação com periodato seguida da redução com borohidreto, demonstraram que uma redução na formação de tumor em 70% em modelo de melanoma, não demonstrando efeito anticoagulante. Estes dados fornecem evidências relacionadas ao potencial de NA-LMMH como um agente anti-metastático, sem qualquer impacto significativo sobre a coagulação (MOUSA et al., 2006).

Portanto, a redução dos grupos aldeído obtidos após a oxidação com periodato também representa uma potencial estratégia de modificação química que pode originar polímeros inovadores e com potencial aplicação biomédica e biotecnológica.

## 2.4 SULFATAÇÃO

Os polissacarídeos sulfatados desempenham papéis diversos na biologia, atuando como componentes estruturais do tecido para agentes de sinalização em processos fisiológicos. Assim sua composição e estrutura, bem como suas propriedades físico-químicas e biológicas são de grande interesse para estudos para o desenvolvimento de novos produtos nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, beleza e saúde (CAPUTO; STRAUB, GRINSTAFF, 2019).

Devido a isso a sulfatação química tem sido uma das estratégias de modificação química mais utilizada para obtenção de polissacarídeos modificados, sendo realizada em polissacarídeos previamente caracterizados com alguma propriedade físico-química a ser alterada ou para o melhor entendimento de uma atividade biológica (CAPUTO; STRAUB, GRINSTAFF, 2019; LOPES et al., 2017; MA et al., 2015; WANG et al., 2013).

O polissacarídeo sulfatado quimicamente pode ser sintetizado ligando um grupo sulfato a um hidroxila através de uma reação de substituição nucleofílica, formando ésteres de sulfato. No entanto não há um único método padrão de síntese de polissacarídeos sulfatos quimicamente, por estes apresentarem grande diversidade estrutural (LI et al. 2016; MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

A escolha do agente sulfatante é um dos parâmetros mais importantes na eficiência de uma reação de sulfatação. Atualmente, o método mais empregado para a sulfatação de um polissacarídeo é o uso de complexos de trióxido de enxofre-amina em solvente orgânico altamente polar, como a dimetilformamida (DMF) ou dimetilacetamida (DMA). As vantagens de complexos de trióxido de enxofre incluem sua relativa estabilidade, facilidade de manuseio e compatibilidade com solventes altamente polares auxiliando na solubilidade dos polissacarídeos (CAPUTO; STRAUB, GRINSTAFF, 2019).

A sulfatação química com objetivo de potencializar as atividades anticoagulantes também é realizada em polissacarídeos naturalmente sulfatados, mas nem sempre resultados satisfatórios são encontrados, sendo que alguns polissacarídeos sulfatados não apresentaram potencialização na atividade anticoagulante (MA et al, 2016; MEDEIROS et al., 2008). Portanto, a simples presença dos grupos sulfatos na estrutura dos polissacarídeos, em alguns casos, não é fator



determinante para a atividade anticoagulante. Os monossacarídeos presentes no polímero devem apresentar a possibilidade de, através de um equilíbrio conformacional, colocar seus grupos sulfato em posições para interagir com grupos básicos da proteína (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

## 2.5 HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO

Hemostasia é o termo usado para descrever a parada do sangramento ou a interrupção do fluxo sanguíneo através de um vaso. A hemostasia é promovida por uma interação altamente regulada entre vasos sanguíneos, plaquetas, fatores de coagulação do plasma e proteínas fibrinolíticas para formação e dissolução de coágulos sanguíneos. Em condições normais, esses processos fisiológicos mantêm o sangue em fluxo normal (SOUSA, 2015; LORENZI, 2006).

A hemostasia pode ser categorizada em processos concomitantes primários (formação de plaquetas), secundários (formação de um coágulo de fibrina estabilizado através da cascata da coagulação) e terciários (formação de plasma a partir da quebra da fibrina via fibrinólise) (HOFFMAN; MONROE, 2007). Após lesão vascular, a resposta primária da hemostasia, que envolve o endotélio vascular e plaquetas, resulta no surgimento de um trombo plaquetário cujo efeito hemostático é transitório. A ativação dos fatores de coagulação culmina na geração de trombina e, subsequentemente, de uma rede de fibrina que reforça e estabiliza o trombo (KANEKO et al., 2008; YORK 2013).

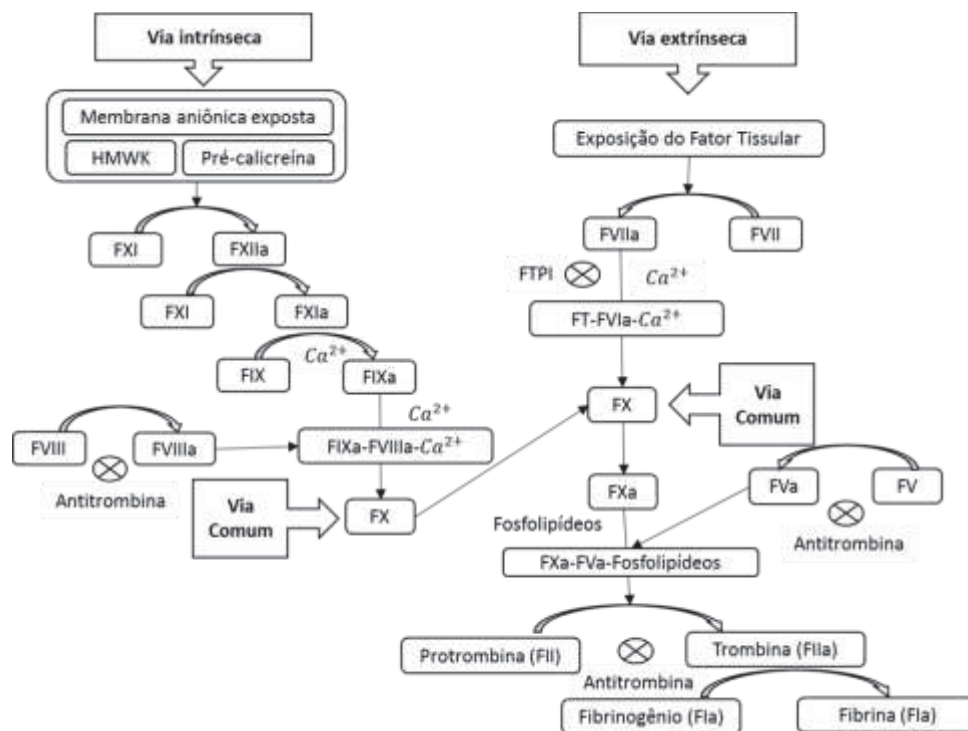
A coagulação é uma série complexa de interações nas quais o sangue perde sua fluidez, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo irreversível (DANTAS; SOUSA, 2007). O mecanismo homeostático primário, com a participação de vasos e plaquetas, é capaz de cessar o sangramento momentaneamente.

Porém, há a necessidade de um mecanismo bioquímico de coagulação sanguínea, que envolve uma sequência de interações proteína-proteína, objetivando a formação de um polímero insolúvel, a fibrina, que forma uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático (FRANCO, 2001; SOUSA, 2015; LORENZI, 2006).



O mecanismo tradicional de coagulação proposto por Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), representa a modelo em cascata mais amplamente difundido quando o assunto é coagulação sanguínea (figura 5) e abrange duas vias: intrínseca (via do fator de contato) e extrínseca (via do fator tissular). Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na via comum, o que leva a conversão do fibrinogênio em fibrina.

FIGURA 5 - VIA CLÁSSICA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA



Fonte: O autor, 2019

A via intrínseca se inicia quando o vaso sofre uma lesão e o sangue entra em contato com o colágeno ou com superfícies aniônicas, sendo um mecanismo de ativação por contato. Essa interação resulta na ativação do fator XII (FXII-FXIIa) na presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alta massa molecular (*High molecular weight kininogen* – HMWK). Como consequência, o fator XIIa ativa o fator XII (FXII-FXIIa), que, por sua vez, converte a pré-caliceína em caliceína, a qual por retroalimentação converte novamente fator XII em XIIa. O fator XIIa converte o fator XI em XIa o qual, na presença de  $Ca^{2+}$ , ativa o fator IX. O fator IXa exerce função dupla, agindo na ativação do fator VIII e na formação do complexo FT-FVIIIa- $Ca^{2+}$ , composto por fator VIII, fator

IX e cálcio; esse complexo é denominado TENASE, e ativa o fator X da coagulação (DAVIE; RATNOFF, 1964; FRANCO, 2001; SOUSA, 2015; LORENZI, 2006).

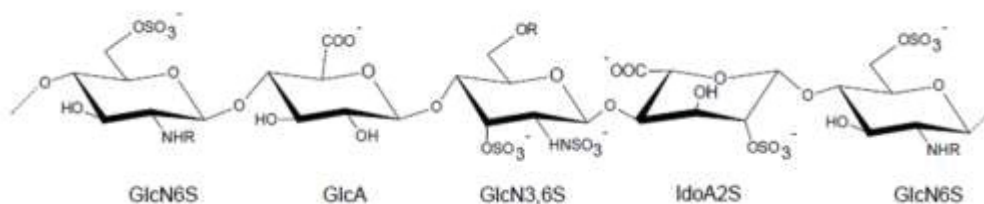
A via extrínseca da coagulação é um caminho alternativo para ativar o fator X sem a participação dos fatores XII, XI, IX e VIII. Quando ocorre uma lesão no vaso, o FT (fator tissular) é exposto e liga-se ao fator FVII, não estando completamente elucidado se essa transformação ocorre por clivagem mediada pelo FT ou se por um mecanismo autocatalítico, o qual na presença de cálcio, é autoclivado em FVIIa e forma o complexo FT-FVIIa- $\text{Ca}^{2+}$ . Este complexo apresenta caráter enzimático e ativa o fator X, formando o fator Xa, o qual inicia a coagulação pela via final comum (DANTAS; SOUSA, 2007; DAVIE; RATNOFF, 1964; FRANCO, 2001; SOUSA, 2015; KANEKO ET AL.2008, VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

As vias intrínseca e extrínseca se complementam e convergem pra a via comum. Nessa via, o FXa, na presença do fator V ativado, cálcio, e fosfolipídios de membrana, formam o complexo protrobinase, que na superfície celular das plaquetas convertem protrobina em trombina. A trombina tem a função de catalisar a proteólise da proteína plasmática solúvel, o fibrinogênio, em monômeros de fibrina. Os monômeros de fibrina se unem formando um polímero gelatinoso, onde aderem às células sanguíneas. Os polímeros de fibrina ainda dependem de uma transformação estrutural para a construção de um coagulo com maior estabilidade e menor solubilidade, isso se dá graças a trombina que ativa o fator XIII que medeia a ligação covalente cruzada dos polímeros de fibrina (FRANCO, 2001; SOUSA, 2015; KANEKO ET AL.2008, VERRASTRO; LORENZI; NETO, 2005).

### 2.5.1 Heparina

A heparina é um polissacarídeo de origem animal utilizada como fármaco no tratamento de disfunções da coagulação sanguínea como agente anticoagulante e antitrombótico. Trata-se de um glicosaminoglicano constituído por uma sequência alternada de  $\alpha$ -D-glucosamina e ácido urônico através de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). As unidades de glucosamina encontram-se majoritariamente desacetilados no nitrogênio e sulfatadas nos grupos amino e hidroxil ( $\text{N-SO}_3$  e  $6\text{-OSO}_3$ ), sendo encontrados grupos sulfato na posição C-3. As unidades de ácido urônico são o ácido  $\beta$ -D-glucurônico e o ácido -idurônico (figura 6) (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

FIGURA 6 - ESTRUTURA PENTASSACARIDICA DA HEPARINA



A heparina é utilizada em distúrbios da homeostase, apesar de apresentar uma estreita janela terapêutica e efeitos adversos, como hemorragia e trombocitopenia. Além dos efeitos adversos, a heparina pode trazer outros riscos relacionados à sua origem, por ser extraída da mucosa intestinal suína e do tecido pulmonar bovino, tendo sido relatados problemas em sua purificação, sendo encontrados contaminantes como dermatam sulfato ou condroitim sulfato oversulfatado, que podem ocasionar graves complicações alérgicas (SASISEKHARAN; SHRIVER, 2009; FILHO, 2009).

Devido aos riscos no uso da heparina existe grande interesse na busca por novos compostos bioativos. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm despertado o interesse de vários grupos de pesquisa nacionais e internacionais como alternativas ao seu uso, por apresentarem semelhanças estruturais, baixos riscos de contaminação viral e de efeitos adversos (MELO et al, 2004; MAO et al., 2005; MOURÃO, 2015; SYNITSYA et al., 2015).

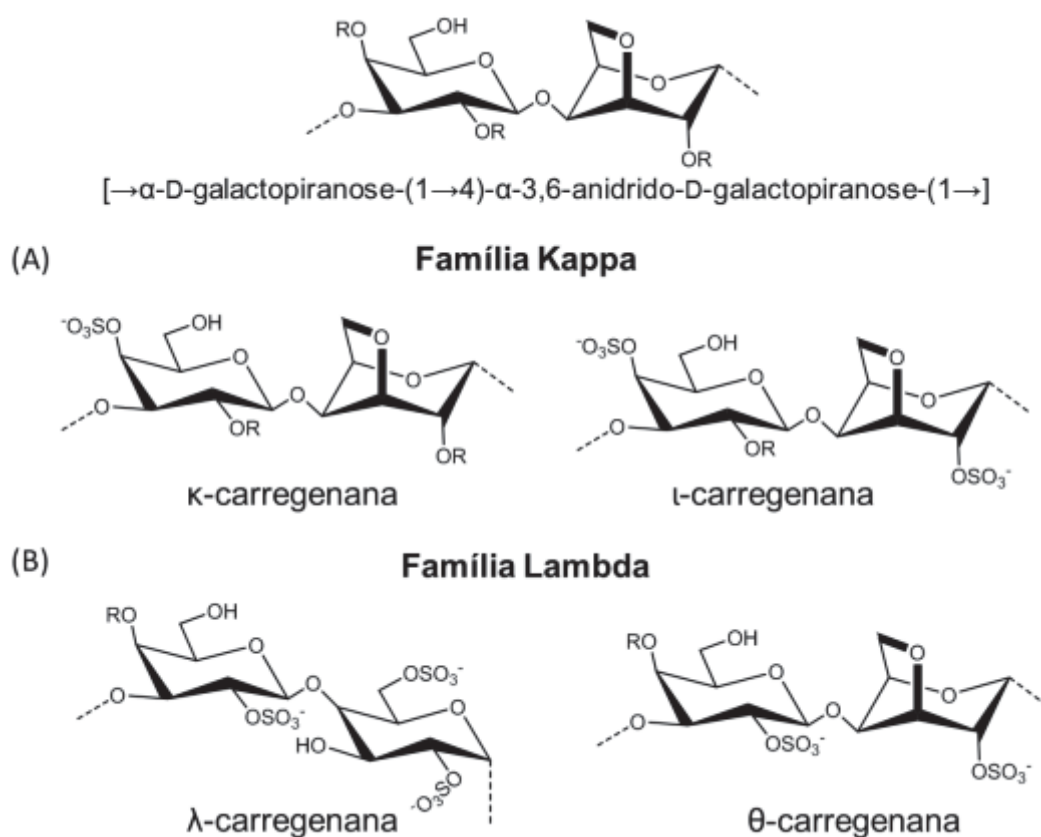
## 2.6 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é avaliada de acordo com suas estruturas. Essa atividade não é dependente unicamente da presença de grupos sulfatado e, além disso, o posicionamento específico destes grupos na molécula é necessário para que ocorra uma interação polar específica entre polissacarídeo e as proteínas presentes na cascata de coagulação. O complexo é estabilizado por interações de curto alcance, conforme já observado para as carragenanas, polissacarídeos naturalmente sulfatados obtidos de

macroalgas vermelhas e que são os mais estudados no âmbito da coagulação (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

As carragenanas são polissacarídeos lineares, solúveis em água e constituídos por unidades de galactose sulfatada. São compostos por unidades  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas em C-3 (unidades A), alternadas por unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose ligadas em C4 (unidades B), ou  $\alpha$ -3,6-anidro-D-galactopiranosose, formando dissacarídeos repetitivos. De acordo com o posicionamento do grupo sulfato, as carragenanas são classificadas em duas principais famílias: *kappa* ( $k$ ) e *lambda* ( $\lambda$ ), conforme representado na figura 7, e de acordo com a presença de unidades 3,6-anidro de galactose 4-ligado e número de grupos sulfato (Knutsen, Myslabodsky, Larsen, & Usov, 1994).

FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DISSACARÍDICA REPETITIVA PRESENTE NAS CARRAGENANAS (A) ESTRUTURA GERAL DAS CARRAGENANAS DA FAMÍLIA KAPPA E LAMBDA (B)



Fonte: Carvalho, 2017.

Como demonstrado por Farias, Valente, Pereira e Mourão (2000), a  $\lambda$ -carragenana, contendo unidades  $\beta$ -D-galactopiranosose 2-sulfato e  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato apresentaram uma maior atividade antitrombótica do que os outros tipos

de carragenanas, fato que foi relacionado ao seu maior teor de sulfato. Carragenanas pertencentes à família  $\lambda$  são conhecidas por apresentar maior atividade anticoagulante em relação as da família  $\kappa$  com teores equivalentes de grupo sulfato (CARLUCCI et al., 1997).

A presença de unidades de galactose 2,3-dissulfato em carragenanas da alga marinha *Botryocladia occidentalis* ocasionou o aumento na atividade anticoagulante. A atividade atribuída em parte à proporção e à distribuição de unidades de galactose 2,3-dissulfato ao longo da cadeia polissacarídica (PEREIRA et al. 2005).

Quando em solução, os polissacarídeos devem ser capazes de alterar sua conformação de aleatória para uma conformação ordenada, fazendo com que a interação polissacarídeo/complexos de proteínas da cascata de coagulação seja possível. Essas mudanças são influenciadas por um equilíbrio entre flexibilidade e rigidez na ligação dos polissacarídeos com as proteínas. Polissacarídeos com maior massa molecular apresentam uma maior probabilidade de encontrar zonas de ligação em função do comprimento, da composição do polissacarídeo e das áreas de ligação, que podem ser estabilizados através de interações de curto alcance, como hidrofóbicas, de hidrogênio e Van der Waals (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

Previamente, carragenanas foram sulfatadas seletivamente a fim de apresentar díades diferentes das encontradas na natureza, e essa modificação química permitiu correlacionar a posição dos grupos sulfato com a atividade anticoagulante. Na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de  $\kappa$ -carragenanas o tempo de APTT foi de 52,6 s (tempo de coagulação do plasma humano normal = 30,8 s). Com sulfatação seletiva em C-6 da unidade A, o tempo de APTT foi 6 vezes maior na mesma concentração. Ou seja, a introdução de um grupo sulfato em C-6 da unidade A de  $\kappa$ -carragenanas influenciou na a atividade anticoagulante (ARAÚJO et al., 2013).

Fucanas, polissacarídeos sulfatados encontrados na parede celular de macroalgas marrons, assim como as carragenanas, também apresentam atividade anticoagulante. As fucanas são constituídas essencialmente de fucose e sulfato, e podem apresentar pontos de ramificação em pequenas proporções de galactose, xilose, manose e ácidos urônicos. Sua cadeia principal é constituída de unidades de  $\alpha$ -L-fucose ligadas (1 $\rightarrow$  2),  $\alpha$ -L-Fucp ligadas(1 $\rightarrow$  3) ou  $\alpha$ -L-fucose ligadas (1 $\rightarrow$  4) (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010. 2010; MOURÃO, 2015).

Unidades de  $\alpha$ -L-fucose podem ser encontradas monossulfatadas na posição C2 ou C4 ou ainda dissulfatadas em C-2/C-4. A atividade anticoagulante de fucanas sulfatadas tem sido atribuída à massa molecular e à presença de unidades  $\alpha$ -L-fucose (1 $\rightarrow$ 3) sulfatadas em C-4 e dissulfatadas em C-2/C-4 (NISHINO *et al.*, 1991; NISHINO; TAKABE; NAGUMO, 1994; FONSECA *et al.*, 2009).

Polissacarídeos obtidos de macroalgas verdes do gênero *Monostroma* também apresentaram atividade anticoagulante. Estudos de estrutura química mostraram que algumas macroalgas deste gênero biossintetizam ramnanas sulfatadas formadas majoritariamente por unidades de ramnose 2-ligada (CHENG *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018). No entanto, polissacarídeos de algas verdes são ainda menos estudados quando comparados com os polissacarídeos biossintetizados pelas macroalgas vermelhas e pardas.

Foram extraídas da macroalga verde *M. angicava*, ramnanas sulfatadas contendo 31,18% de grupos sulfato, 8,26% de ácidos urônicos e Mw de 91,9 kDa. A análise de metilação mostrou que a cadeia principal deste polissacarídeo é formada majoritariamente por unidades de ramnose (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3), e (1 $\rightarrow$ 2,3) ligadas, e ainda em menor quantidade unidades de xilose (1 $\rightarrow$ 4) ligadas. As unidades de ramnose (1 $\rightarrow$ 3) ligadas apresentavam grupos sulfato em C2. As ramnanas sulfatadas de *M. angicava* mostraram potente atividade anticoagulante *in vitro*, apresentando tempo de APTT de >200 s na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (LIU *et al.*, 2018).

Também foi observada potente atividade anticoagulante para as ramnanas sulfatadas da macroalga *M. latissimum*. Através de hidrólise ácida, ramnanas sulfatadas deram origem a uma nova fração contendo 25% de grupos sulfato e Mw de 33,6 kDa. A análise de metilação mostrou que os polissacarídeos desta fração são formados majoritariamente por unidades de ramnose (1  $\rightarrow$  2) –ligadas e (1  $\rightarrow$  3) – ligadas sulfatadas em C2. Esta ramnana apresentou um tempo de APTT de >200 s na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (CHENG *et al.*, 2017).

## 2.7 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS

Dependendo da estrutura química e das conformações que são possíveis quando em solução, os polissacarídeos podem desenvolver estruturas tais como esferas compactas, emaranhados ao acaso, bastões ou hélices. A conformação



que um polissacarídeo adota em solução depende do solvente, da temperatura e da sua estrutura química primária (WHISTLER, 1973).

As propriedades físico-químicas de carboidratos dependem principalmente da composição monossacarídica, ligação glicosídica, grupos funcionais presentes, massa molecular e ramificações. Além disso, as modificações químicas afetam a estrutura dos carboidratos, podendo resultar em mudanças nas propriedades físicas dessas moléculas, tais como raio de giro, raio hidrodinâmico, comprimento de persistência e viscosidade (GUO et. al., 2013; REED, 1995; ROSS-MURPHY 1994).

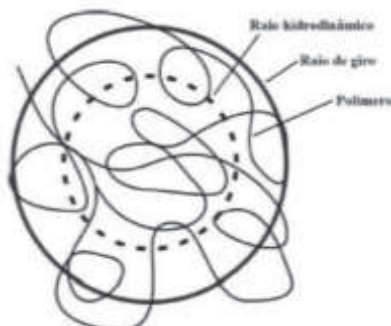
### 2.7.1 Raio de giro e raio hidrodinâmico

O raio de giro ( $R_g^2$  ou  $\langle S^2 \rangle$ ) é um parâmetro que caracteriza o tamanho de uma molécula a partir das médias das distâncias do centro de gravidade da cadeia polimérica. Representa as médias das distâncias entre o centro de gravidade de uma molécula e a sua superfície. Assim, é o segundo momento de distribuição de massa sobre o centro de gravidade. Quando todas as possíveis conformações da cadeia são consideradas, então há valor médio de  $R_g$  (REED, 1995; ROSS-MURPHY 1994).

O raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) representa o raio de uma esfera hipotética, sendo que polímeros em um solvente se comportam como esferas rígidas impenetráveis ao solvente, que ocupa o mesmo volume da cadeia polimérica. Ambos os parâmetros podem ser obtidos através de análises de espalhamento de luz laser (GUO et. al., 2013).

O  $R_g$  e o  $R_h$  podem ser obtidos também através de análises viscosimétricas. A relação entre raio de giro e raio hidrodinâmico está representada na figura 8.

FIGURA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE RAO DE GIRO E RAO HIDRODINÂMICO



FONTE: Giacomelli, (2008)



### 2.7.2 Comprimento de persistência

O comprimento de persistência ( $L_p$ ), é um parâmetro que caracteriza a correlação da direção do um segmento de cadeia polimérica com os segmentos precedentes. O valor do comprimento leva em conta os comprimentos de ligação, ângulos de valência e parâmetro de impedimento estérico, relacionado com a rigidez do polímero. Está definido como a projeção média da distância ponta-a-ponta de uma cadeia infinita na direção do primeiro segmento. É expresso em nm e representa o tamanho do segmento rígido da molécula (ALGER, 2017; REED, 1991).

É obtido através da equação:

$$\langle Rg^2 \rangle = \frac{LL_p}{3} - L_p^2 + \frac{2L_p^3}{L} - \left( \frac{2L_p^4}{L^2} \right) \left[ 1 - \exp\left(-\frac{L}{L_p}\right) \right]$$

Onde  $Rg^2$  é o raio de giro ao quadrado e  $L$  é o comprimento de contorno do polímero, o que é obtido pela equação:

$$L = n_i l$$

Onde  $n_i$  é o grau de polimerização e  $l$  é o tamanho da unidade repetitiva.

### 2.7.3 Viscosidade

Soluções poliméricas apresentam maior resistência ao fluxo com maior tempo de escoamento quando comparadas com o solvente puro. Ou seja, soluções poliméricas apresentam maior resistência ao fluxo, ocasionada pelo atrito entre as moléculas, e essa resistência é denominada viscosidade (WYATT, 1993; REED, 1996).

Quando a viscosidade é extrapolada para o limite de “diluição infinita” ou concentração zero, é possível obter o valor de viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , o qual está relacionada com o volume hidrodinâmico ocupado por uma molécula isoladamente, e representa o inverso da densidade do polímero em solução, sendo expressa em dL.g<sup>-1</sup>.

1. É medida a partir de uma solução diluída de macromoléculas e gera informações sobre a forma macromolecular, flexibilidade e massa molar de macromoléculas (WYATT, 1993; REED, 1996).

Através da equação de Mark-Houwink-Sakurada é possível relacionar viscosidade intrínseca com a massa molar do polímero:

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Tanto K quanto  $\alpha$  são determinados experimentalmente, através de um gráfico que relaciona a viscosidade intrínseca com o aumento da massa molar do polissacarídeo. K está relacionada à flexibilidade da cadeia, inclusive à orientação das ligações glicosídicas, enquanto  $\alpha$  reflete a geometria da cadeia ramificada, que pode ser esfera, haste, bastão e emaranhado ao acaso. Os parâmetros K e  $\alpha$  são constantes para um polímero em solução com solvente e temperatura fixos. Para moléculas emaranhadas ao acaso flexíveis em solução, o valor de  $\alpha$  permanece entre 0,5 e 0,8; para polímeros,  $\alpha$  gira em torno de 0,8 e no caso de cadeias rígidas, o valor de  $\alpha$  é superior a 1,0 (YOUNG, LOVELL, 1991; PICOUT, ROSS-MURPHY, 2007).

A partir da viscosidade intrínseca é possível determinar o raio de giro através da equação de Flory-Fox (FLORY, 1953). Com equação de Flory-Fox é possível relacionar massa molecular, raio de giro e viscosidade intrínseca. Nesta equação a viscosidade intrínseca é inversamente proporcional à  $M_w$ :

$$[\eta] = \frac{\varphi_0 6^{3/2} R_g^3}{M_w}$$

onde  $\varphi_0$  é o parâmetro de viscosidade,  $R_g$  é o raio de giro e  $M_w$  é a massa molecular ponderal média em peso (FREITAS et al., 2005).

## 2.8 DICROISMO CIRCULAR

O estudo da estrutura das biomoléculas em solução é tradicionalmente realizado através de propriedades ópticas, utilizando-se de vários métodos, incluindo espectroscopia e polarimetria. A polarimetria de CD (*circular dichroism*) é uma

metologia utilizada para moléculas quirais, as quais apresentam diferenças na absorção da luz polarizada circularmente à esquerda e à direita à medida que interagem com os grupos vizinhos e sua solução (LOUIS-JEUNE et al. 2012)

A diferença de absorção da luz polarizada pode ser expressa como elipticidade molar ( $\theta$ ). Técnicas de CD são mais comumente utilizadas para estudar a concentração, com base na lei de Beer, da estrutura secundária de proteínas, como  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  que produzem espectros característicos na região do ultravioleta (UV) entre 190 e 250 nm. Essas mudanças na conformação de proteínas são ocasionadas pela ligação peptídica ou desdobramentos termodinâmicos, que são facilmente identificados. Entretanto como a maioria dos monossacarídeos absorve luz em regiões com comprimentos de onda  $<200$  nm, equipamentos convencionais de CD não são capazes de analisar, sendo necessárias técnicas de UVCD (*ultra vacuum circular dichroism*) em comprimentos de onda entre 160 e 200 nm, que são utilizados para estudar a estereoquímica de monossacarídeos e o arranjo de ligações entre eles (FASMAN, 1996; LOUIS-JEUNE et al., 2012; MCREYNOLDS; GERVAY-HAGUE, 2000).

CD de carboidratos é uma área de pesquisa instigante e desafiadora. A análise dos dados tem-se provado ser mais complexa para os carboidratos do que a para peptídeos e proteínas. Isto se deve à diferenças estruturais entre carboidratos e proteínas. O CD de peptídeos e proteínas dependem da absorbância dos grupos amino da molécula. Peptídeos e proteínas são compostos de aminoácidos, que dão origem a um padrão regular e repetitivo, que diferem apenas em alguns grupos presentes nas cadeias laterais, enquanto carboidratos diferem, não só na composição e espaçamento das unidades repetitivas, mas, também nos tipos de ligação glicosídica, podendo existir carboidratos lineares e ramificados. Além disso, carboidratos ocorrem na natureza em ambas as formas isoméricas, forma D mais comum e a forma L menos comum, enquanto as proteínas são compostas apenas pelos aminoácidos L (LOUIS-JEUNE et al., 2012; MCREYNOLDS; GERVAY-HAGUE, 2000).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DA ESPÉCIE ESTUDADA

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Sub-filo: Chlorophytina

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Ulvaceae

Gênero: *Ulva*

Espécie: *Ulva fasciata* Delile

FIGURA 9 - EXEMPLAR DE *Ulva fasciata*



FONTE: Guiry, 2018.

### 3.2 COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* (Clorophyta) foram coletados em Bombinhas-SC e identificados pela Profa. Dra. Franciane Maria Pellizzari (UNESPAR, Paranaguá-PR).

### 3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *ULVA FASCIATA*

Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* foram secos em estufa a 50 °C, moídos em moinho de faca e então submetidos à extração aquosa (6% m/v) a 80 °C sob agitação mecânica. Após centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. O precipitado etanólico foi ressolubilizado em água, concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo, dialisado sequencialmente (membrana de 12-14 kDa) contra solução de NaCl 1 mol.L<sup>-1</sup> (16 h) e água destilada e, então, liofilizado, originando a fração polissacarídica F1.

O resíduo de alga foi submetido a mais duas extrações aquosas, como descrito acima, originando assim as frações F2 e F3. Esse processo descrito foi realizado por Carvalho, 2017. Parte da fração polissacarídica F2 foi utilizada nas modificações químicas realizadas por Carvalho, 2017, e outra parte desta fração foi utilizada neste trabalho, enquanto as frações F1 e F3 foram destinadas a outros projetos do grupo de pesquisa Glican (Laboratório de glicobiologia estrutural de algas marinhas). O fluxograma da extração está representado na figura 10.

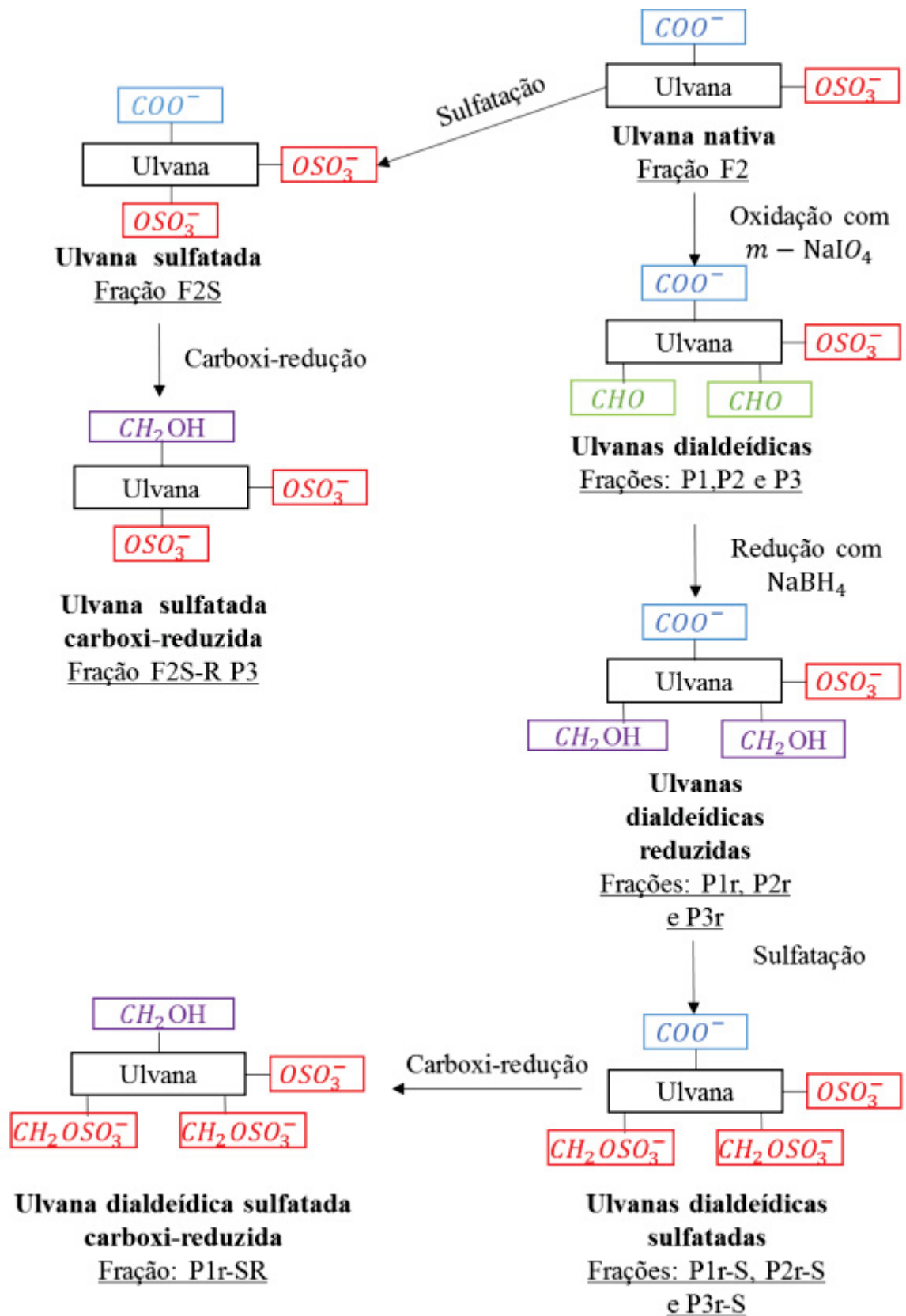
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE *U. fasciata*

FONTE: Carvalho, 2017.

### 3.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS ULVANAS

O fluxograma das modificações químicas realizadas no presente trabalho, bem como a denominação das frações obtidas após estas reações, estão apresentados na Figura 11.

FIGURA 11 – ESQUEMA DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS DE *U. fasciata* REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO





### 3.3.1 Oxidação com *meta*-periodato de sódio

A oxidação com periodato foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Goldstein et al., 1965. Numa solução de F2 (2,5 g em 190 mL de água destilada) foram adicionados 190 mL de *meta*-periodato de sódio ( $m\text{-NaIO}_4$  0,1 mol.L<sup>-1</sup>) para obter-se a concentração final de 0,05 mol.L<sup>-1</sup>. A solução permaneceu sob agitação no escuro a 4 °C. Decorrido o tempo de reação, foram adicionados 25,3 mL de etilenoglicol (para consumir o excesso de  $m\text{-NaIO}_4$ ), ficando sob agitação por 30 minutos. Sequencialmente, a solução foi dialisada em membrana de 6-8 kDa contra NaCl 1 mol.L<sup>-1</sup> e água destilada, congelada e liofilizada. A reação de oxidação foi realizada nos tempos de 24, 48 e 72 horas, originando as frações P1, P2 e P3.

### 3.3.2 Redução com borohidreto de sódio

Visando a redução dos grupos aldeído das ulvanas dialdeídicas a álcoois primários, as frações P1, P2 e P3 (1200 mg em 182 mL de água) foram reduzidas com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ , 1800 mg) por 24 h a 4°C. Decorrido o tempo de reação, as amostras foram neutralizadas com ácido acético: água 1:1 até pH próximo de 5,0, então dialisadas (6 - 8 kDa), congeladas e liofilizadas, obtendo-se as frações P1r, P2r e P3r.

### 3.3.3 Sulfatação

A reação de sulfatação foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Araújo et al., 2013, com modificações. Inicialmente as frações F2, P1r P2r e P3r foram dialisadas por 12 h contra uma solução de 3% de trietilamina, congeladas e liofilizadas, e posteriormente solubilizadas (300 mg em 2 mL de DMFa (dimetilformamida anidra)). Adicionou-se, lentamente e sob agitação magnética, 3 g  $\text{SO}_3\text{-Py}$  e 2 mL de 2M2B (2-metil-2-butenol), mantendo a reação por 7 h, a 30 °C. A reação foi interrompida em banho de gelo e neutralizada com bicarbonato de sódio 1,0 mol. L<sup>-1</sup>. O polissacarídeo foi recuperado do meio reacional através da adição de etanol (3 volumes) e centrifugado. Após 12 horas a 4°C, o precipitado foi redissolvido em água destilada, dialisado em membrana de 1 kDa, contra NaCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, por 24 h

e em seguida com água destilada, congelado e liofilizado, obtendo-se as frações F2S, P1r-S, P2r-S e P3r-S.

### 3.3.4 Carboxi-redução das frações F2-S e P1r-S

O processo de carboxi-redução de F2S e P1r-S foi realizado de acordo com os métodos de Taylor e Conrad (1972) e Anderson e Stone (1985). Primeiramente, 50 mg de F2S e P1rS foram solubilizadas em tampão MES  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,75). Em seguida adicionou-se vagarosamente carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] (CMC) na proporção de  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  de carbodiimida:50  $\mu\text{Eq}$  de carboxila. Após agitação por 1 hora, o pH foi ajustado para 7,0 através da adição de tampão TRIS  $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $\text{NaBH}_4$  foi adicionado vagarosamente até a obtenção de uma solução  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ . Após 2 horas, em temperatura ambiente e sob agitação, a solução foi neutralizada com ácido acético (1:1 v/v), dialisada (membrana 1 kDa) e liofilizada, obtendo-se as frações F2S-R e P1r-SR.

## 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

### 3.4.1 Determinação do teor de carboidratos

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) utilizando como padrão uma solução  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ramnose (70%) e ácido glucurônico (30%). O método apresenta linearidade entre 10 – 40  $\mu\text{g}$  de carboidrato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Belpotonics modelo SP1105 no comprimento de onda de 480 nm.

### 3.4.2 Determinação do teor de proteínas

As dosagens de proteínas totais foram realizadas pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu. O método apresenta linearidade entre 5 – 100  $\mu\text{g}$  de proteína. O padrão utilizado foi uma solução de albumina de soro bovino (BSA  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Belpotonics modelo SP1105 no comprimento de onda de 660 nm.

### 3.4.2 Determinação de grupos sulfato

Os teores de sulfato foram determinados pelo método de Dodgson e Price (1962), usando como reagente a mistura gelatina-bário. Inicialmente foi realizada a hidrólise total dos polissacarídeos utilizando HCl 1M, por 5 horas a 105°C, para liberação dos grupamentos sulfato. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio (100 µg/100 µL) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Belphotonics modelo SP1105 no comprimento de onda de 360 nm. O método apresenta linearidade entre 20 – 200 µg de sulfato.

### 3.4.3 Dosagem de ácidos urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando o *m*-hidroxibifenila. O padrão utilizado foi uma solução de ácido glucurônico (100 µg.mL<sup>-1</sup>). O método apresenta linearidade entre 1 – 40 µg de ácidos urônicos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Belphotonics modelo SP1105 no comprimento de onda de 525 nm.

## 3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de <sup>13</sup>C (31,45 ppm) quanto para <sup>1</sup>H (2,225 ppm). As análises foram realizadas na temperatura de 70 °C.

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas um total de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D<sub>2</sub>O, na concentrações de 50 - 80 mg.mL<sup>-1</sup>. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz. As frações foram solubilizadas em D<sub>2</sub>O, congeladas e liofilizadas (esse processo foi repetido duas vezes). As amostras foram solubilizadas em D<sub>2</sub>O na concentração de 30 mg.mL<sup>-1</sup>.

As condições de aquisição dos espectros de RMN bidimensionais (HSQC, COSY, TOCSY e HMBC) foram utilizadas conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 512 (F1) K, com janela espectral de 4085 (F2) x 15923 (F1) Hz. Todos os espectros foram analisados com o auxílio do programa TOPSPIN 3.5p17.

### 3.6 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

A atividade anticoagulante das frações nativas e modificadas quimicamente foi avaliada pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), tempo de protrombina (PT) e tempo de trombina (TT). Os testes foram realizados no coagulômetro COAG-A-MATE XM da marca Organon Técnica, utilizando plasma ovino. Como controle positivo de coagulação foi utilizada salina 0,9% (em água ultrapura) e como controle negativo de coagulação foi utilizada a heparina não fracionada (calbiochem, 100 KU,  $2.5 \times 10^3$  g.mol<sup>-1</sup>; 10 µg.mL<sup>-1</sup>).

#### 3.6.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

Para o teste de APTT, foram incubados 100 µL de plasma com 100 µL de solução salina (controle) ou amostra (0-50 µg de polissacarídeo/mL) ou heparina, a 37 °C por 1 minuto, seguido de 100 µL de cefalina de coelho e re-incubação por 2,5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio 0,025 M, para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi determinado em quadriplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 300 s.

#### 3.6.2 Tempo de protrombina (PT)

Para o teste de PT, foram incubados 100 µL de plasma com 100 µL de solução salina (controle) ou amostra (0 - 50 µg de polissacarídeo/mL), ou heparina a 37 °C por 1 minuto. Em seguida, 200 µL pré-aquecidos de reagente comercial para ensaio de PT foram adicionados para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi

determinado em quadriplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 100 s.

### 3.6.3 Tempo de trombina (TT)

Para realizar o ensaio de TT, foram incubados 100  $\mu$ L plasma com solução salina ou amostra (0 - 50  $\mu$ g de polissacarídeo/mL), ou heparina a 37 °C por 1 minuto a 37 °C. Então, 200  $\mu$ L pré-aquecidos (37 °C) de reagente comercial para o ensaio de TT foram adicionados. O tempo de coagulação foi determinado em quadriplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 100 s.

## 3.7 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO DE ALTO DESEMPENHO (HPSEC)

O perfil cromatográfico das amostras foi determinado em cromatógrafo de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas quatro colunas WATERS, conectadas em série, limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  g.mol<sup>-1</sup> (Colunas Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120, respectivamente), e solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup>) contendo azida de sódio (NaN<sub>3</sub> 200 ppm) como eluente a 20 °C.

## 3.8 DICROÍSMO CIRCULAR

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em espectropolarímetro Jasco (J-815) em comprimentos de onda que variaram entre 197 e 250 nm. As amostras analisadas foram diluídas em água ultra pura e solução salina (0,9 % de NaCl) e analisadas em 25°C e 37°C. Cada espectro obtido refere-se à média de três mensurações repetidas sobre cada amostra, e os dados obtidos foram reportados como elipicidade molar (deg x cm<sup>2</sup> x dmol).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS ULVANAS NATIVAS

Os polissacarídeos da alga verde *U. fasciata* foram os utilizados por Carvalho, 2017, a partir da alga seca e moída por extração aquosa a 80 °C, originando a fração F2.

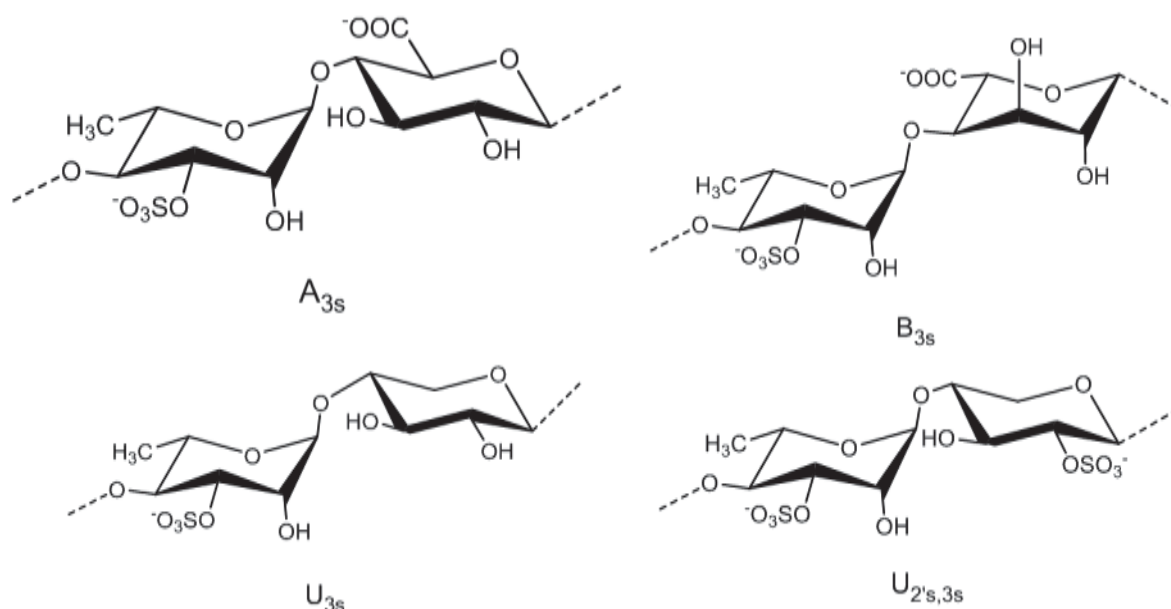
F2 foi caracterizada inicialmente por Carvalho, 2017, através de análises químicas e espectroscópicas (RMN 1D e 2D) com as quais foi possível relacionar sua estrutura química com as descritas na literatura para ulvanas isoladas de algas do gênero de *Ulva* (LAHAYE; RAY, 1996; QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE, 1998; CASSOLATO, 2008; FREITAS et al., 2105; COLODI, 2017; CARVALHO et al., 2018). Os resultados obtidos para a ulvana F2, serão descritos a seguir e servirão como base para as modificações químicas realizadas no presente trabalho.

As análises químicas e espectroscópicas mostraram que a fração F2 é constituída por polissacarídeos sulfatados contendo unidades de  $\alpha$ -L-ramnose,  $\beta$ -D-xilose e ácidos urônicos. Estes dados estão de acordo com o que é relatado na literatura para as ulvanas de outras espécies do gênero *Ulva* (PERCIVAL; WOLD, 1963; LAHAYE; RAY, 1996; QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE, 1998; TOSKAS et al., 2011; FREITAS et al. 2015).

Através de análises da região anomérica do espectro de HSQC de F2, foram encontrados os acoplamentos referentes as díades U3s:  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-3S-(1}\rightarrow)]$  (104,8/4,64 e 98,9/4,90 ppm); U2'3s:  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp2S-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-3S-(1}\rightarrow)]$  (100,5/4,97 e 99,3/4,92 ppm) A3s:  $([\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-GlcpA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-3S-(1}\rightarrow)]$  (104,4/4,64 e 101,1/4,82) e B3s:  $([\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-3S-(1}\rightarrow)]$  (104,1/5,13 e 102,2/4,91) (LAHAYE; BRUNEL; BONIN, 1997; LAHAYE; INIZAN; VIGOUROUX, 1998; LAHAYE, 1998). A correlação em 98,9/4,86 ppm foi atribuída à unidade ramnose entre  $\beta$ -D-xilose e  $\beta$ -D-xilose 2-sulfato (LAHAYE, 1998). Os demais assinalamentos estão apresentados na tabela 1.



TABELA 1 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DA FRAÇÃO F2.



Díade	Unidade	C-1/H-1	C-2/H-2	C3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
$A_{3s}$	[ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ ]	101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
		104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
$U_{3s}$	[ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ ]	98,9/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,2/4,05	~18,2/1,33
		104,8/4,64	74,8/3,35	75,3/3,65	75,5/3,65	63,7	
$U'_{2s,3s}$	[ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xylp-2S-(1 $\rightarrow$ ]	99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,4/4,05	~18,2/1,33
		100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,65	63,1	
$B_{3s}$	[ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-IdopA-1 $\rightarrow$ ]	102,2/4,91	70,4/4,24	79,4/4,61	79,4/3,79	69,4/4,00	~18,2/1,33
		104,1/5,13	71,7/3,68	72,7/3,83	80,2/4,02	72,1/4,58	~175,3

Fonte: Carvalho, 2017

Desta maneira, as análises químicas e de RMN permitiram concluir que as ulvanas nativas presentes na fração F2 são constituídas pelas díades  $A_{3s}$ ,  $B_{3s}$ ,  $U_{3s}$  e  $U'_{2s,3s}$ , (CARVALHO, 2017; CARVALHO et al. 2018).



## 4.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO F2

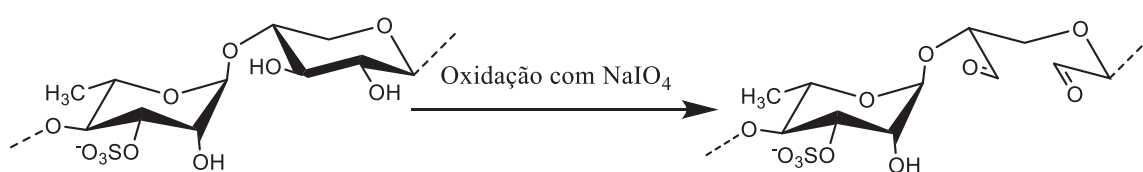
No presente trabalho ulvanas presentes na fração F2 foram submetidas a diferentes tipos de modificações químicas como: reações de oxidação com *m*-NaIO<sub>4</sub> em diferentes tempos, conforme descrito por Carvalho et al.(2018). Os grupos aldeídos presentes no processo anterior foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub>, para então realizar a sulfatação química do polímero.

## 4.3 OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO F2 COM META-PERIODATO DE SÓDIO

A oxidação com *m*-periodato da fração F2 foi realizada com o objetivo de obter ulvanas dialdeídicas, através da clivagem oxidativa de unidades que possuem hidroxilas vicinais, acarretando na quebra da ligação C-C e formação de dois grupos aldeído em cada uma das unidades oxidadas.

Como ulvanas são polissacarídeos constituídos majoritariamente por ligações glicosídicas do tipo 1→4, a reação com periodato oxida as unidades monossacarídicas contendo hidroxilas vicinais, levando à ruptura da ligação C-C entre C2 e C3, originando unidades 2,3-dialdeídicas (GOLDSTEIN *et al.*, 1965).

FIGURA 12 - EXEMPLO DE UMA DÍADE DE ULVANA PASSÍVEL DE OXIDAÇÃO COM NaIO<sub>4</sub>



A fração F2 foi oxidada por 24, 48 e 72 horas, originando as frações P1, P2 e P3.

### 4.3.1 Rendimento, análises químicas e espectroscópicas das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3

O rendimento de material recuperado, com relação ao material inicial submetido à oxidação, foi de 93,4, 92,9 e 80,0% para P1, P2 e P3, respectivamente

A análise de carboidratos totais dos produtos oxidados não mostrou uma diminuição nos teores de carboidratos como o encontrado por Carvalho, 2017. Esse fato se deve à possível formação de hemiacetais que ocorre entre o aldeído de uma unidade oxidada com a hidroxila da unidade vizinha não oxidada. Para contornar esse problema, Bahl, Hullar e Smith, 1964, reduziram glucanas oxidadas com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) para que fosse possível determinar os valores corretos de carboidratos totais.

A determinação colorimétrica de ácidos urônicos mostrou que houve uma diminuição no teor de ácidos urônicos de 19,2% (F2) para 14,8, 14,7 e 13,7% para P1, P2 e P3, respectivamente. Esse resultado indicou que 70,3% dos ácidos urônicos foram resistentes à oxidação com periodato de sódio, mesmo após 72 h de reação.

Os teores de grupo sulfato das frações oxidadas foram similares ao teor encontrado para F2, indicando que a reação com periodato não ocasionou a dessulfatação do polímero. Todos os produtos obtidos após a oxidação com periodato apresentaram teor de proteínas abaixo de 4%.

TABELA 2 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2, P1, P2 E P3

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) <sup>a</sup>	Ácidos urônicos (%) <sup>b</sup>	Sulfato (%) <sup>c</sup>	Proteínas (%) <sup>d</sup>
F2	10,0 <sup>e</sup>	71,1	19,2	18,4	3,7
P1	93,4 <sup>f</sup>	69,8	14,8	18,2	3,8
P2	92,9 <sup>f</sup>	68,7	14,7	18,2	3,5
P3	80,0 <sup>f</sup>	69,3	13,7	18,1	3,9

<sup>a</sup>Dubois *et al.*, 1956. <sup>b</sup>Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. <sup>c</sup>Dodgson; Price, 1962. <sup>d</sup>Lowry *et al.*, 1951. <sup>e</sup>Em relação à alga seca e moída. <sup>f</sup>Material recuperado após a oxidação com periodato.

#### 4.3.2 Análise de RMN das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3

As frações P1, P2 e P3, obtidas após a oxidação com periodato foram analisadas por RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Foi observado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  destas frações o surgimento de novos sinais na região de 90,3-91,3 ppm, que representam os carbonos dos grupos aldeído em C-2 e C-3 na forma de diol e/ou hemiacetal (Figura 13), estando de acordo com o descrito por Senchenkova e colaboradores (1999), Gomez; Rinaudo; Villar (2007) e por Carvalho *et al.* (2018). Os hidrogênios destes

grupos foram assinalados em 4,97, 5,06, 5,15 e 5,19 ppm (Figura 14). Em menor intensidade, foi observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  o sinal do hidrogênio dos grupos aldeído livres em 9,7 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

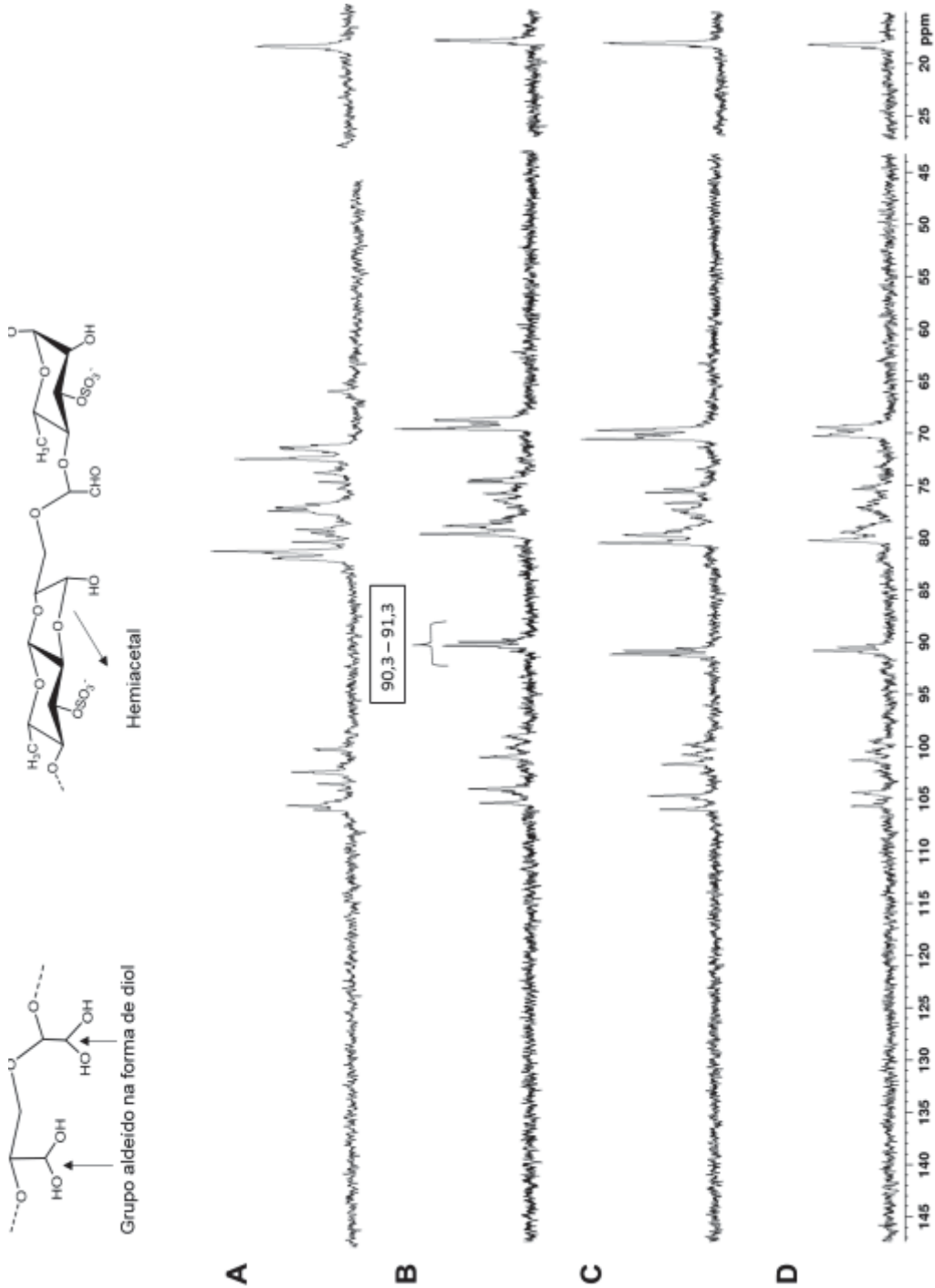
Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações P1, P2 e P3 foram assinalados os C-1 das unidades de  $\beta\text{-D-Xylp}$  2-sulfato em 100,5 ppm (Figura 13). Esta unidade não sofre oxidação com periodato, como esperado, por não apresentar hidroxilas vicinais.

A identificação das novas díades formadas após a oxidação com periodato foi realizada através das análises de RMN por  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , e HSQC (Figuras 13-17). Os assinalamentos das unidades presentes nestas frações estão representados na tabela 3.

No espectro de HSQC (Figura 16) das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3, a correlação anomérica em 105,7/4,79 ppm foi atribuída ao C-1/H-1 dos derivados 2,3-dialdeído xilose. Esta correlação está de acordo com o C-1/H-1 dos derivados de xilose obtidos após a oxidação com  $\text{NaIO}_4$  e redução com  $\text{NaBH}_4$  da região de *link* da heparina (ALEKSEEVA et al., 2014).

A correlação do espectro de HSQC em 99,7/5,09 ppm foi atribuída ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 3-sulfato da díade U3soxA. O C-5 destas unidades foi assinalado no espectro de HMBC em 69,2 ppm. A correlação em 99,7/5,06 ppm no espectro de HSQC foi atribuída à presença de ramnose 3-sulfato, entre o derivado de xilose 2,3-dialdeído e a unidade de  $\beta\text{-D-xilose}$  2-sulfato.

FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D)

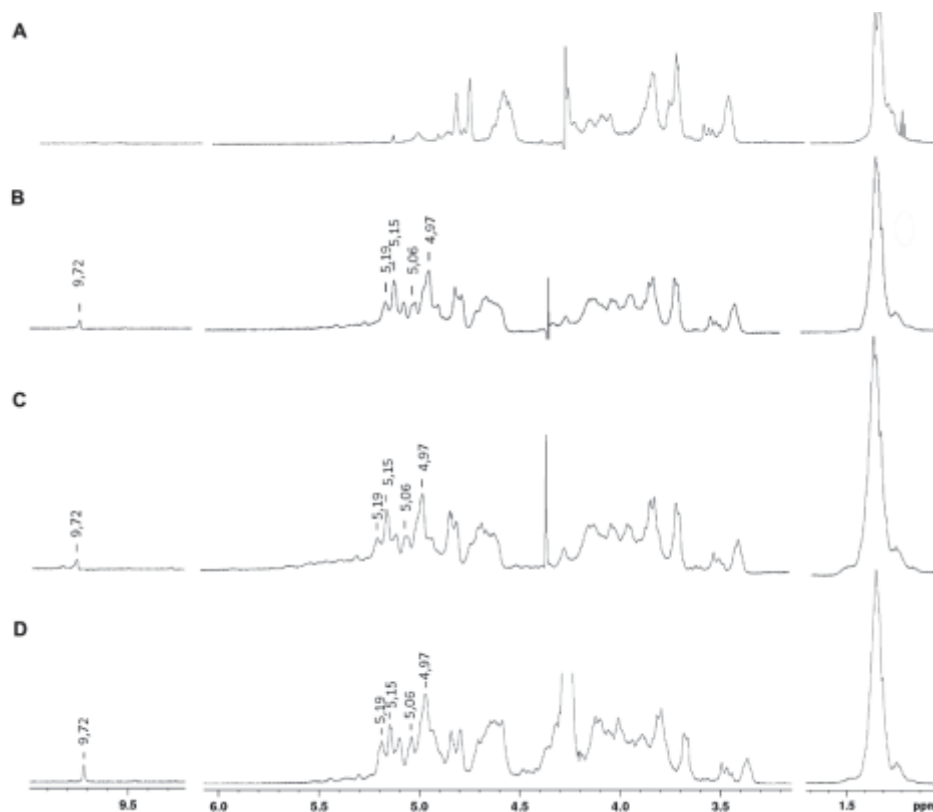


Nota: Solvente = D<sub>2</sub>O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

As correlações referentes às unidades de ácido glucurônico foram assinaladas para todos os produtos oxidados com periodato, confirmando assim que unidades de ácido glucurônico podem ser resistentes a oxidação devido à baixa oxidação com periodato dessas unidades. Há, no entanto, em menor proporção derivados de 2,3-dialdeído-ácido glucurônico, não foram encontrados sinais de ácido idurônico.

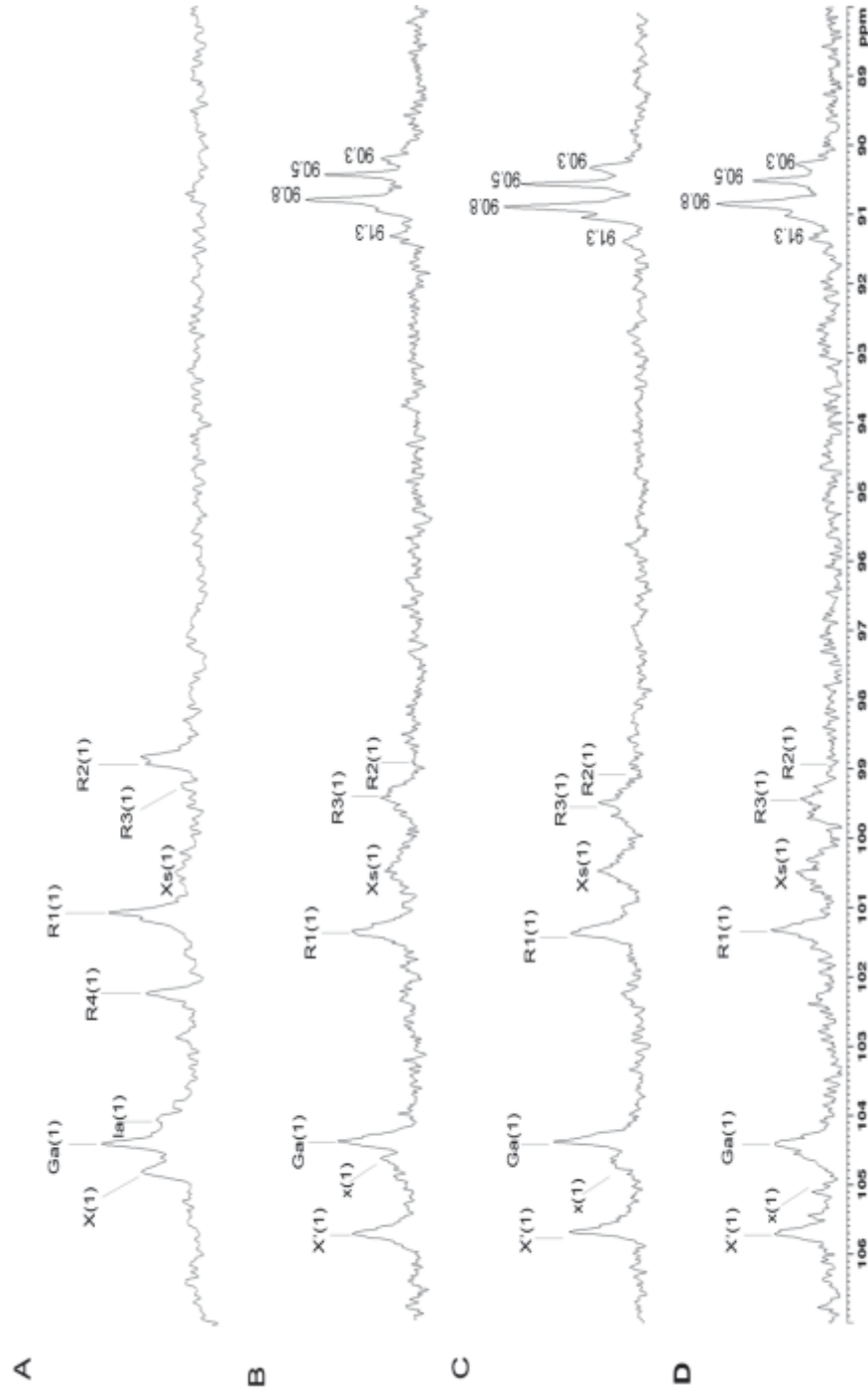
No espectro de HSQC das frações P1, P2 e P3, as correlações em 104,4/4,89 e 104,4/4,95 ppm foram atribuídas aos derivados de ácidos glucurônico e ácido idurônico. As díades contendo os derivados 2,3-dialdeído-ácido glucurônico foram denominadas B3<sub>SOXA</sub> e 2,3-dialdeído-ácido idurônico foram denominadas A3<sub>SOXA</sub> (CARVALHO, 2017). Esta correlação está de acordo com o C-1/H-1 dos derivados 2,3-dialdeído ácido glucurônico e idurônico obtidos após a oxidação-redução via NaIO<sub>4</sub>-NaBH<sub>4</sub> da heparina (ALEKSEEVA et al., 2014).

FIGURA 14 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) E P3 (D)



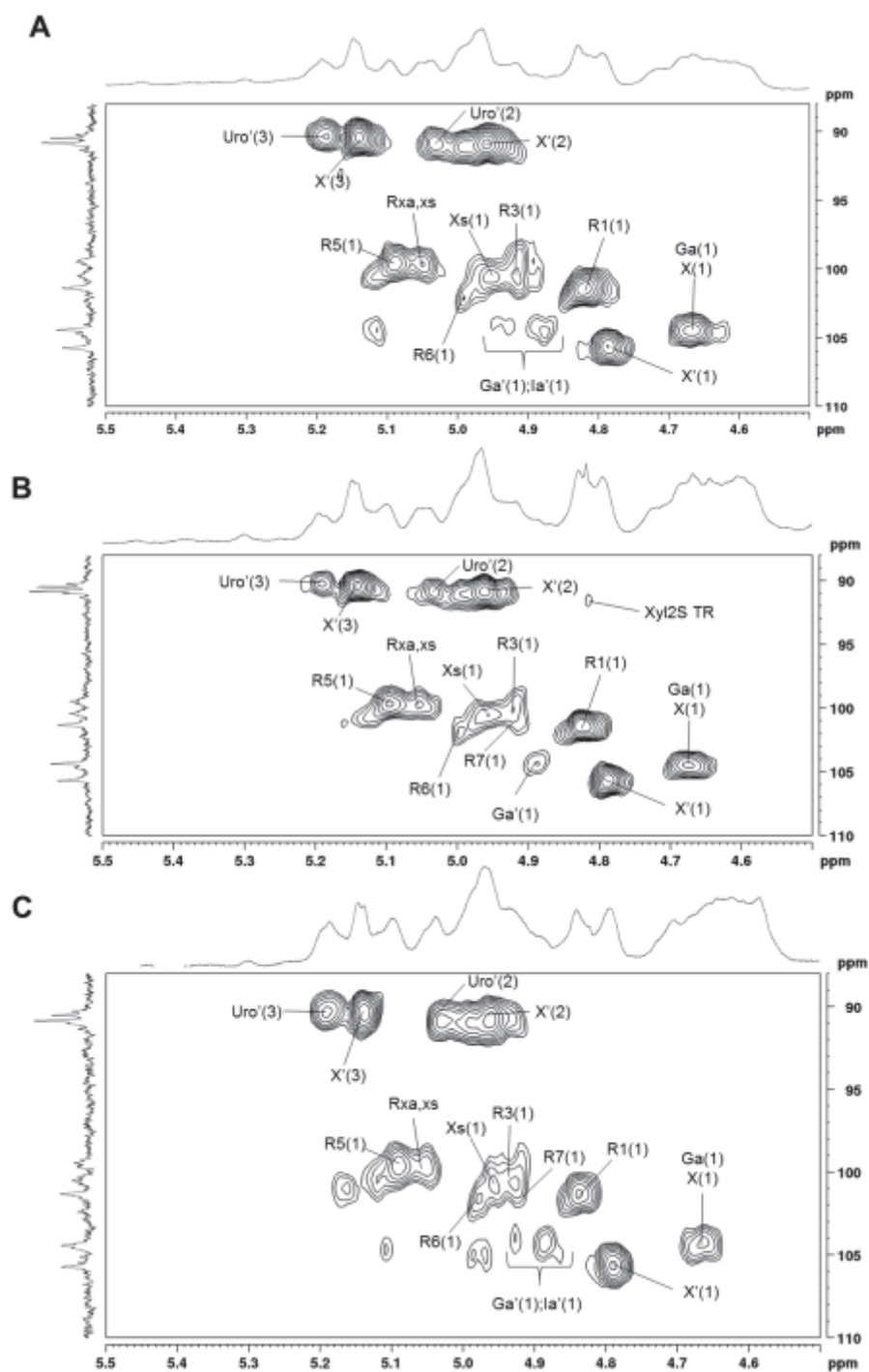
Nota: Solvente = D<sub>2</sub>O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 2,225 ppm.

FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (REGIÃO DE 110-85 ppm) DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D)



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm. Ga e R1 =  $\beta$ -D-ácido glucurônico e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{A}_{3\text{s}}$ ; X e R2 =  $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{U}_{3\text{s}}$ ; Xs e R3=  $\beta$ -D-xilose 2-sulfato e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{U}_{2\text{s},3\text{s}}$ ; la e R4 =  $\alpha$ -L-ácido idurônico e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{B}_{3\text{s}}$ , X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{U}_3$

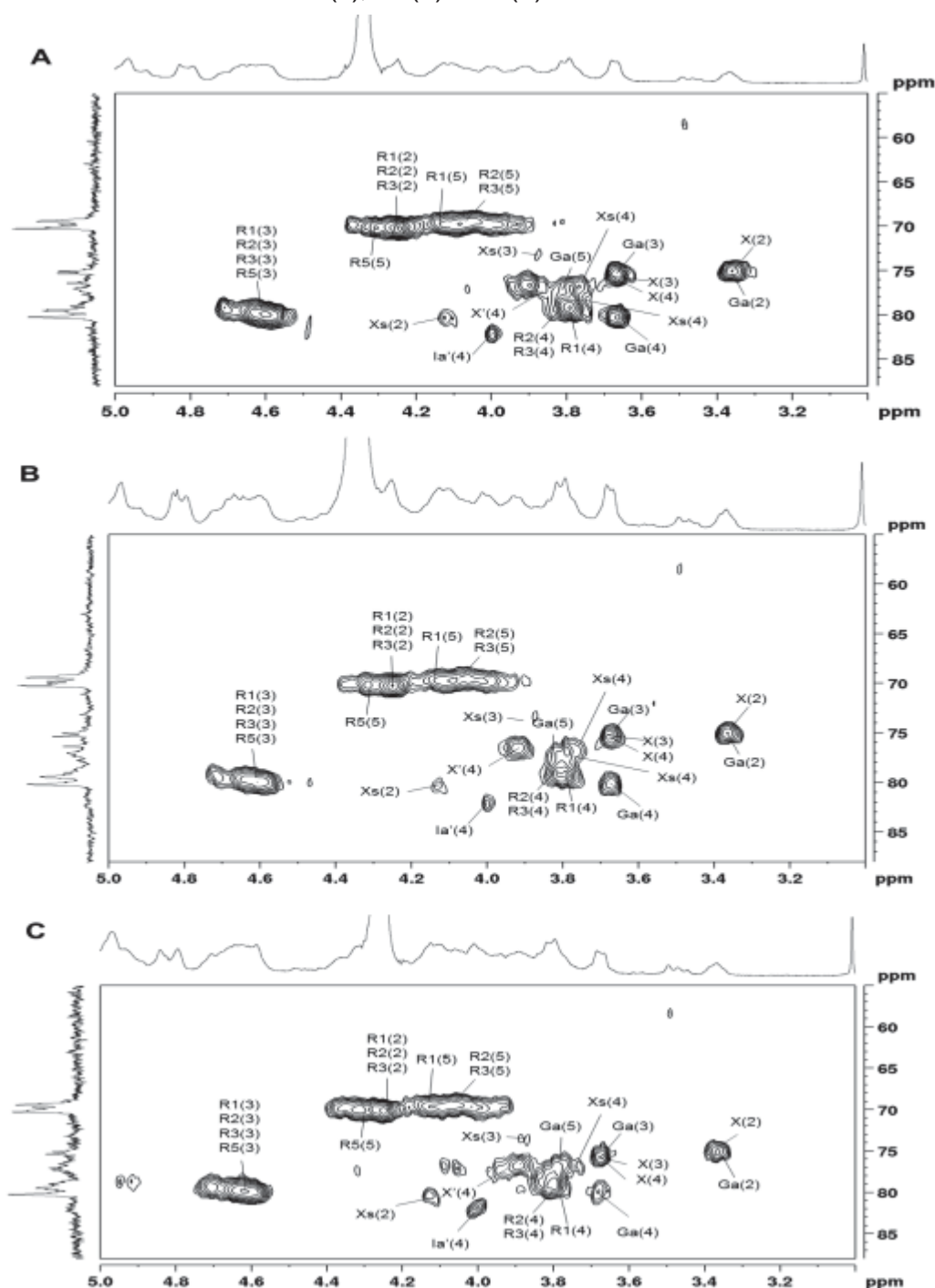
FIGURA 16 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 110-88 PPM E 5,5-4,5 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)



NOTA: Solvente = D<sub>2</sub>O. Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para <sup>1</sup>H (2,225 ppm) e <sup>13</sup>C (31,45 ppm). Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A<sub>3s</sub>; X e R2 = β-D-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>3s</sub>; Xs e R3 = β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>2's,3s</sub>; Ia e R4 = α-L-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B<sub>3s</sub>; X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>3soxA</sub>; Ia' e R6 = derivado 2,3-dialdeído-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B<sub>3soxA</sub> e Ga = derivado 2,3-dialdeído-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato da díade A<sub>3soxA</sub>. Rxa,xs = α-L-ramnose 3-sulfato entre o derivado 2,3-dialdeído-xilose e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

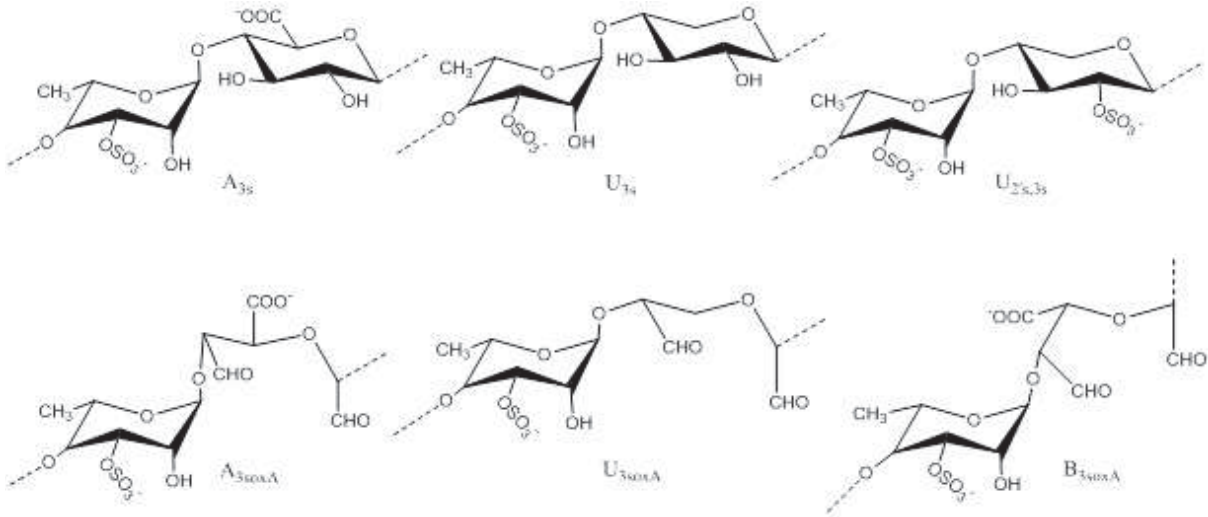


FIGURA 17 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 88-55 PPM E 5,0-3,0 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)



NOTA: Solvente = D<sub>2</sub>O. Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para <sup>1</sup>H (2,225 ppm) e <sup>13</sup>C (31,45 ppm). Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A<sub>3s</sub>; X e R2 = β-D-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>3s</sub>; Xs e R3 = β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>2's,3s</sub>; Ia' e R4 = α-L-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B<sub>3s</sub>; X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>3soxA</sub>; Ia' e R6 = derivado 2,3-dialdeído-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B<sub>3soxA</sub> e Ga = derivado 2,3-dialdeído-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato da díade A<sub>3soxA</sub>. Rxa, xs = α-L-ramnose 3-sulfato entre o derivado 2,3-dialdeído-xilose e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

TABELA 3 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1, P2 E P3.



Díade	Unidade	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
<b>A<sub>3s</sub></b> <sup>ab.c.</sup>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→]	101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
	4)-β-D-GlcA-(1→]	104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
<b>U<sub>3s</sub></b> <sup>a.</sup>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→]	98,9/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,2/4,05	~18,2/1,33
	4)-β-D-Xylp-(1→]	104,8/4,64	74,8/3,35	75,3/3,65	75,5/3,65	n.i.	n.i.
<b>U<sub>2's,3s</sub></b> <sup>ab.c.</sup>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→]	99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	n.i.	n.i.
	4)-β-D-Xylp-2S-(1→]	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,65	n.i.	n.i.
<b>U<sub>3soxA</sub></b> <sup>ab.c.</sup>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→]	99,7/5,09	70,3/4,32	79,4/4,64	n.i.	n.i.	n.i.
	4)-β-D-Xyl-2,3CHO-(1→]	105,7/4,79	90,8/4,97*	90,5/5,15	77,1/3,80	n.i.	n.i.
<b>B<sub>3soxA</sub></b> <sup>ab.c.</sup>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→]	102,4/4,96	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	4)-α-L-IdoA-2,3CHO-(1→]	104,4/4,95	90,8/5,05*	90,5/5,19	82,3/4,00	n.i.	n.i.
<b>A<sub>3soxA</sub></b> <sup>b.c.</sup>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→]	101,5/4,92	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	4)-β-D-GlcA-2,3CHO-(1→]	104,4/4,89	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

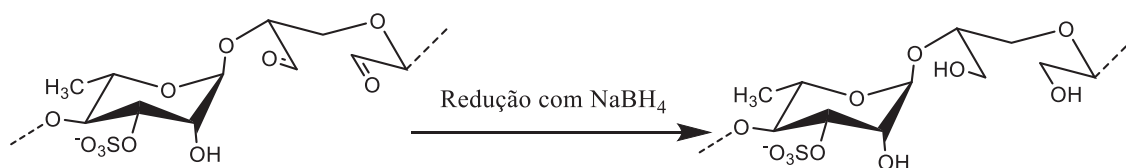
<sup>a,b,c</sup>Presente nas frações P1, P2 e P3, respectivamente. n.i.: não identificado.

Portanto, em conjunto, as análises química e de RMN indicam que a oxidação com periodato em diferentes tempos de reação formam ulvanas dialdeídicas contendo derivados de xilose, ácido glucurônico e ácido idurônico 2,3 dialdeído. Nas frações P1, P2 e P3 foram identificadas as díades A<sub>3s</sub>, U<sub>3s</sub>, U<sub>3soxA</sub>, U<sub>2's,3s</sub> e B<sub>3soxA</sub>. Os resultados encontrados são similares ao encontrados por Carvalho, 2017 para ulvanas dialdeídicas.

#### 4.4 REDUÇÃO DAS FRAÇÕES P1, P2 E P3 COM BORIDRETO DE SÓDIO

Visando a redução dos grupos aldeído de ulvanas dialdeídicas, as frações P1, P2 e P3 foram reduzidas com boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), (figura 18) originando as frações P1r, P2r e P3r. A ocorrência da reação de redução foi confirmada através da comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e HSQC, que serão apresentados no decorrer deste tópico.

FIGURA 18 - REDUÇÃO COM  $\text{NaBH}_4$  DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS DERIVADOS DE ULVANAS OBTIDOS APÓS OXIDAÇÃO COM  $\text{NaIO}_4$



##### 4.4.1 Análises químicas das ulvanas dialdeídicas reduzidas P1r, P2r E P3r

O rendimento e as análises químicas das frações P1r, P2r e P3r, com relação a P1, P2 e P3, estão representados na tabela 4. O material recuperado, com relação ao material inicial submetido à oxidação foi de 96,9, 89,6 e 99,3 % para P1r, P2r e P3r, respectivamente. Devido à possível formação de hemiacetais, que ocorre entre o aldeído de uma unidade oxidada com a hidroxila da unidade vizinha não oxidada, não foi possível determinar o teor correto de carboidratos na dosagem de carboidratos totais nas frações dialdeídicas.

Para contornar esse problema, a dosagem de carboidratos totais foi realizada com as frações reduzidas com boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), sendo assim possível determinar os valores de carboidratos totais sem a interferência da formação de hemiacetais (BAHL; HULLAR; SMITH, 1964). Esses resultados foram comparados com os valores de carboidratos totais da fração F2. A análise de carboidratos totais mostrou uma diminuição no teor de carboidratos de 71,7% (F2) para 46,3, 44,5 e 43,2% (P1r, P2r e P3r, respectivamente). Esses resultados indicam que após 72 horas de oxidação com periodato houve oxidação de aproximadamente 28,7% das unidades monossacarídicas presentes no polímero original.

Os teores de ácidos urônicos e grupos sulfato de P1r, P2r e P3r foram similares aos de suas frações de origem P1, P2 e P3.

TABELA 4 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES P1r, P2r E P3r E DE SUAS FRAÇÕES DE ORIGEM P1, P2 E P3.

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) <sup>a</sup>	Ácidos urônicos (%) <sup>b</sup>	Sulfato (%) <sup>c</sup>	Proteínas (%) <sup>d</sup>
<b>F2</b>	10,0 <sup>e</sup>	71,1	19,2	18,4	3,7
<b>P1</b>	93,4 <sup>f</sup>	69,8.	14,8	18,2	3,8
<b>P1r</b>	97,0 <sup>g</sup>	46,3	14,0	18,0	3,3
<b>P2</b>	92,9 <sup>f</sup>	68,7	14,7	18,2	3,5
<b>P2r</b>	89,6 <sup>g</sup>	44,5	13,9	18,1	3,1
<b>P3</b>	80,0 <sup>f</sup>	69,3	13,7	18,1	3,9
<b>P3r</b>	99,3 <sup>g</sup>	43,3	12,7	17,4	3,5

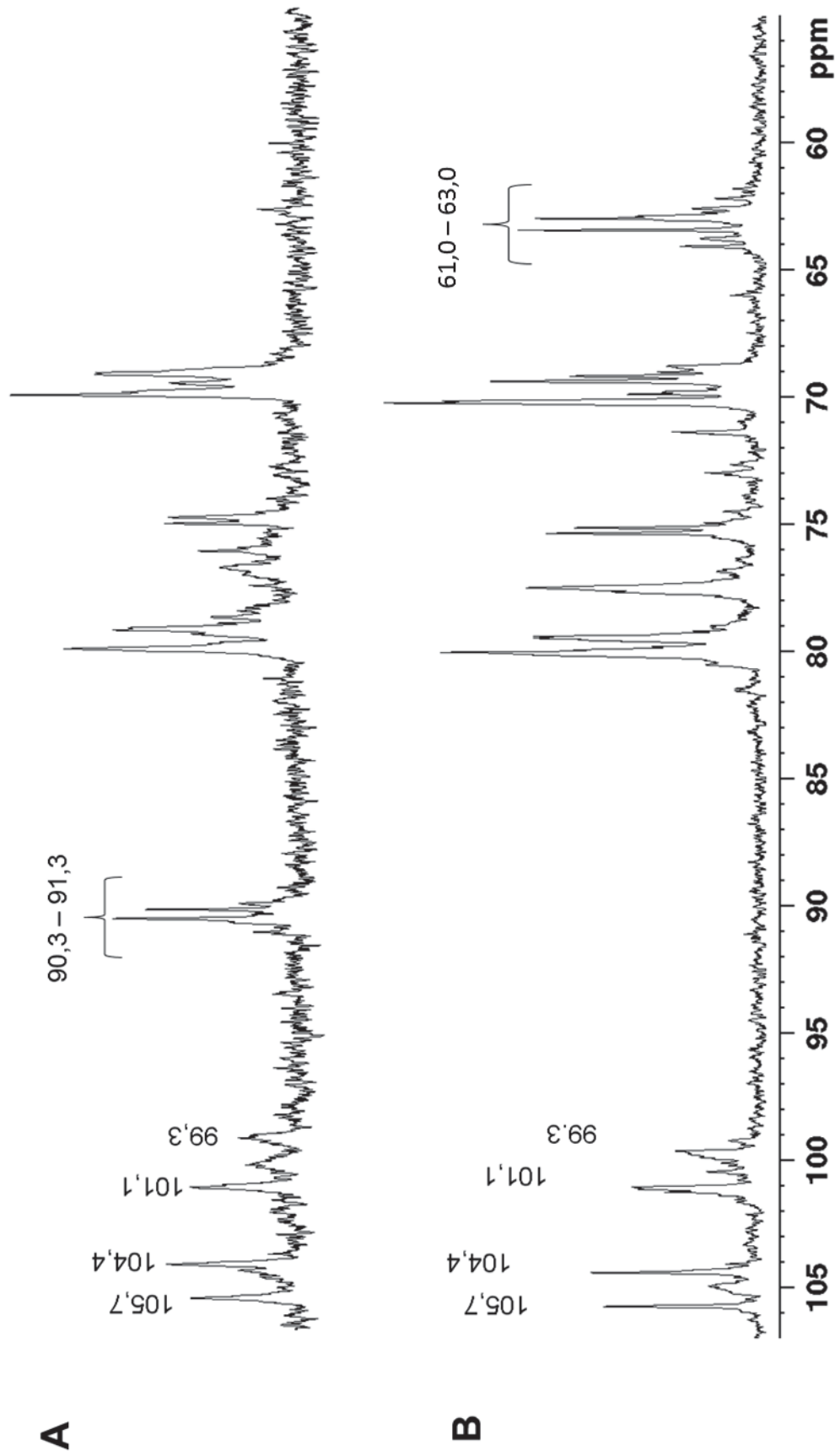
<sup>a</sup>Dubois *et al.*, 1956. <sup>b</sup>Filissetti-Cozzi; Carpita, 1991. <sup>c</sup>Dodgson; Price, 1962. <sup>d</sup>Lowry *et al.*, 1951. <sup>e</sup>Em relação à alga seca e moída. <sup>f</sup>Material recuperado após a oxidação com periodato. <sup>g</sup>Material recuperado após a redução com borohidreto. n.a.: Não analisado.

#### 4.4.2 Análise de RMN das ulvanas dialdeídicas após redução com NaBH<sub>4</sub>

Análises de RMN de <sup>13</sup>C mostraram que após o tratamento das frações P1, P2 e P3 com NaBH<sub>4</sub>, as quais originaram as frações P1r, P2r e P3r, houve o desaparecimento dos sinais na região de 90,3-91,3 ppm, concomitante ao surgimento dos sinais na região de 61,8-66,0 ppm (Figura 19). Estes novos sinais foram atribuídos aos carbonos dos álcoois primários em C-2 e C-3 dos derivados de xilose e ácido idurônico. Portanto, a reação de redução com NaBH<sub>4</sub> foi efetiva na redução dos grupos aldeído à álcoois primários das unidades que foram susceptíveis à oxidação com periodato.

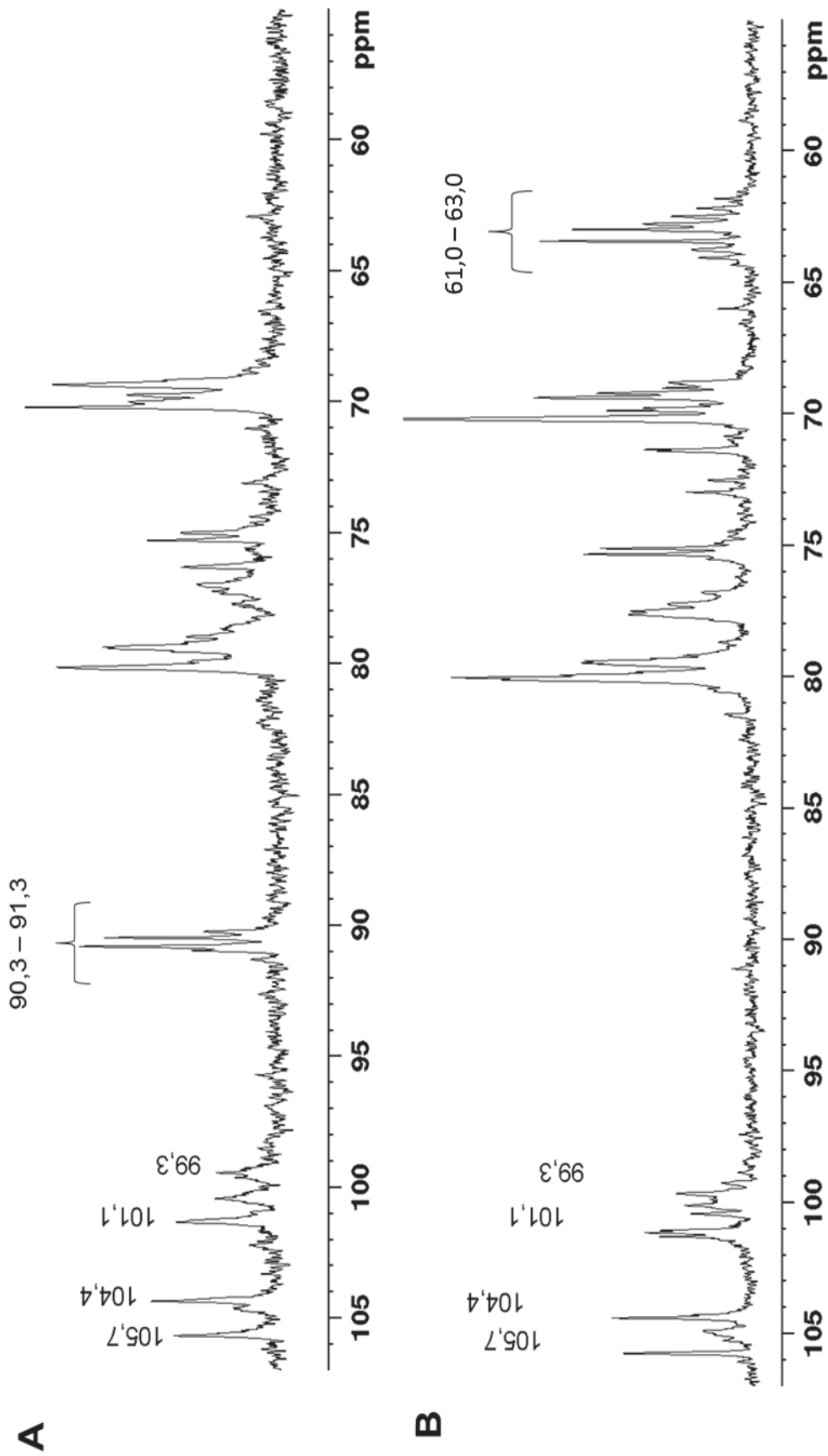
As análises de RMN de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H e HSQC, permitiram identificar as díades presentes nas frações P1r, P2r e P3r (Figuras 19 - 24). As correlações destas díades estão representadas na tabela 5.

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO P1 ANTES (A) E P1r OBTIDA APÓS A REDUÇÃO COM  $\text{NaBH}_4$  (B)



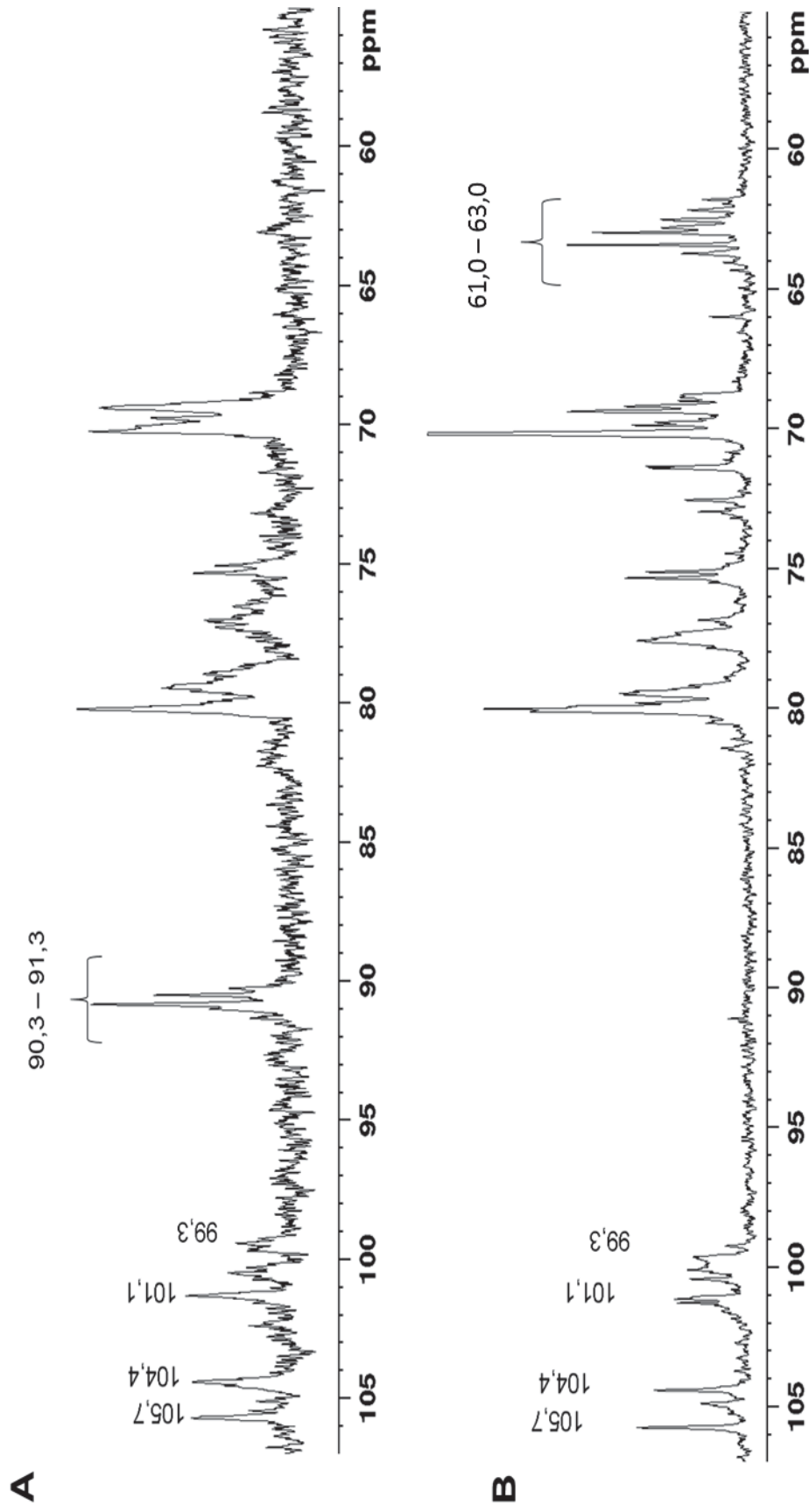
Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO P2 ANTES (A) E P2r OBTIDA APÓS REDUÇÃO COM  $\text{NaBH}_4$  (B)



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

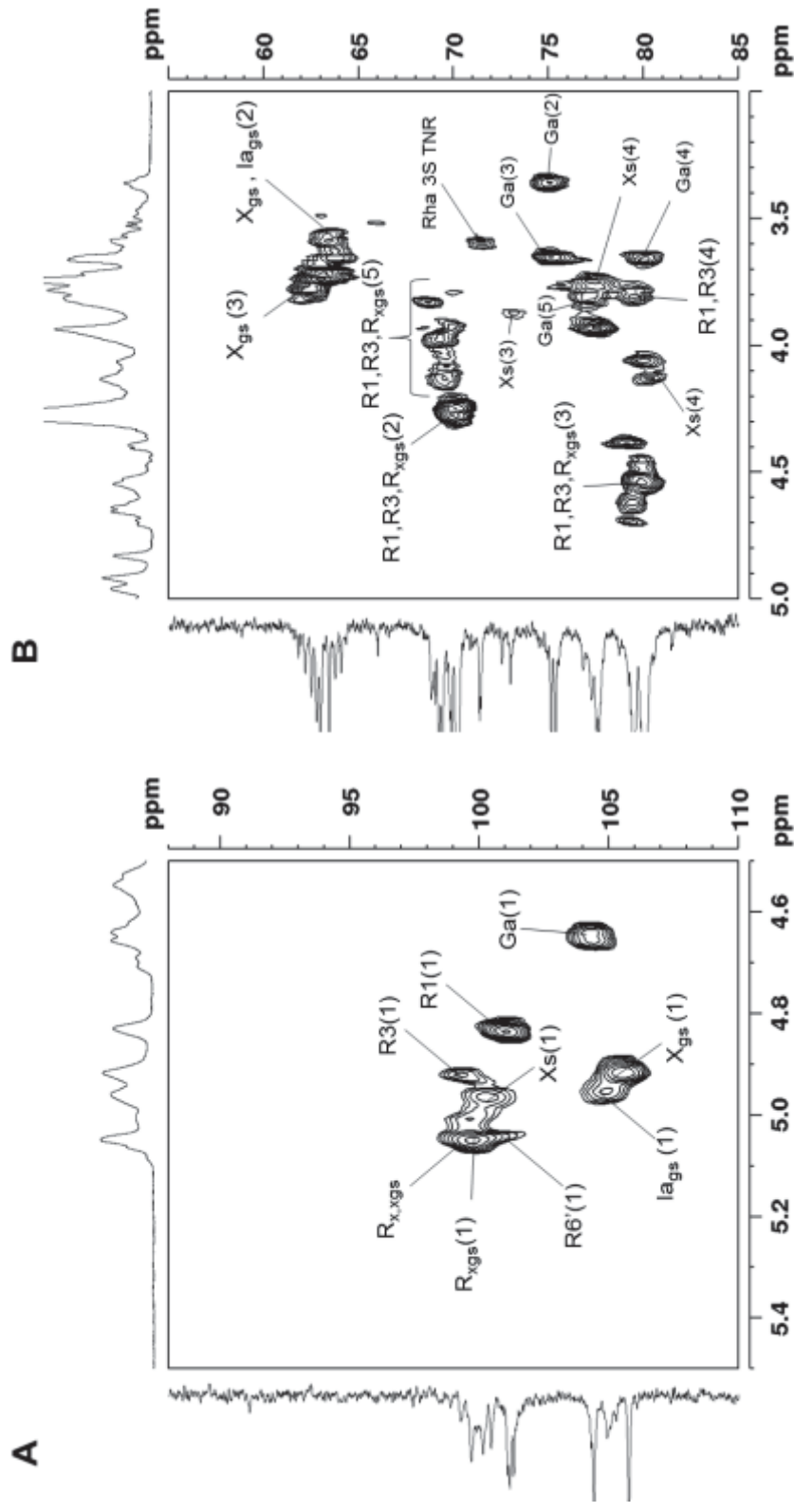
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO P3 ANTES (A) E P3r OBTIDA APÓS REDUÇÃO COM  $\text{NaBH}_4$  (B)



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

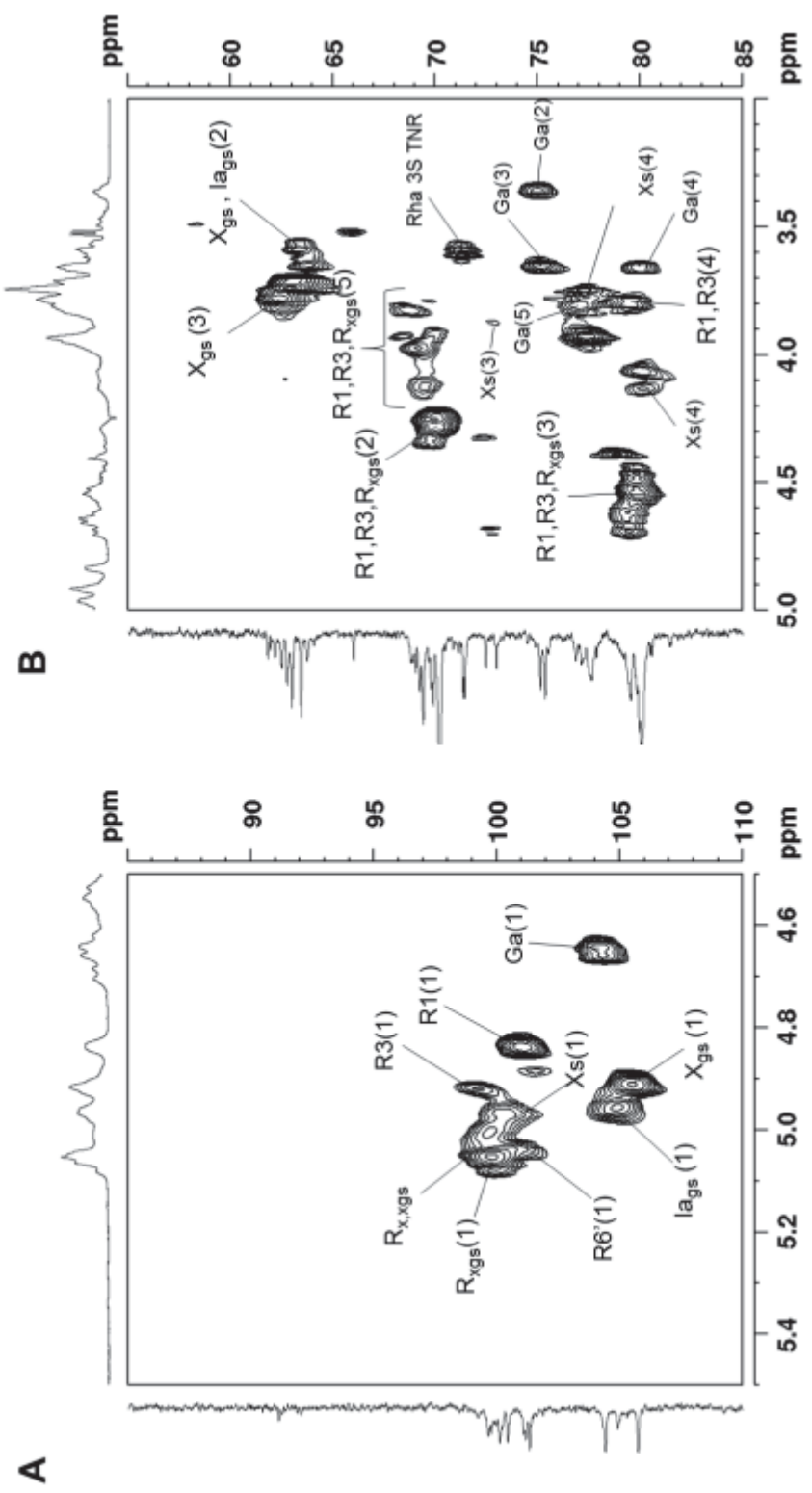


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P1r



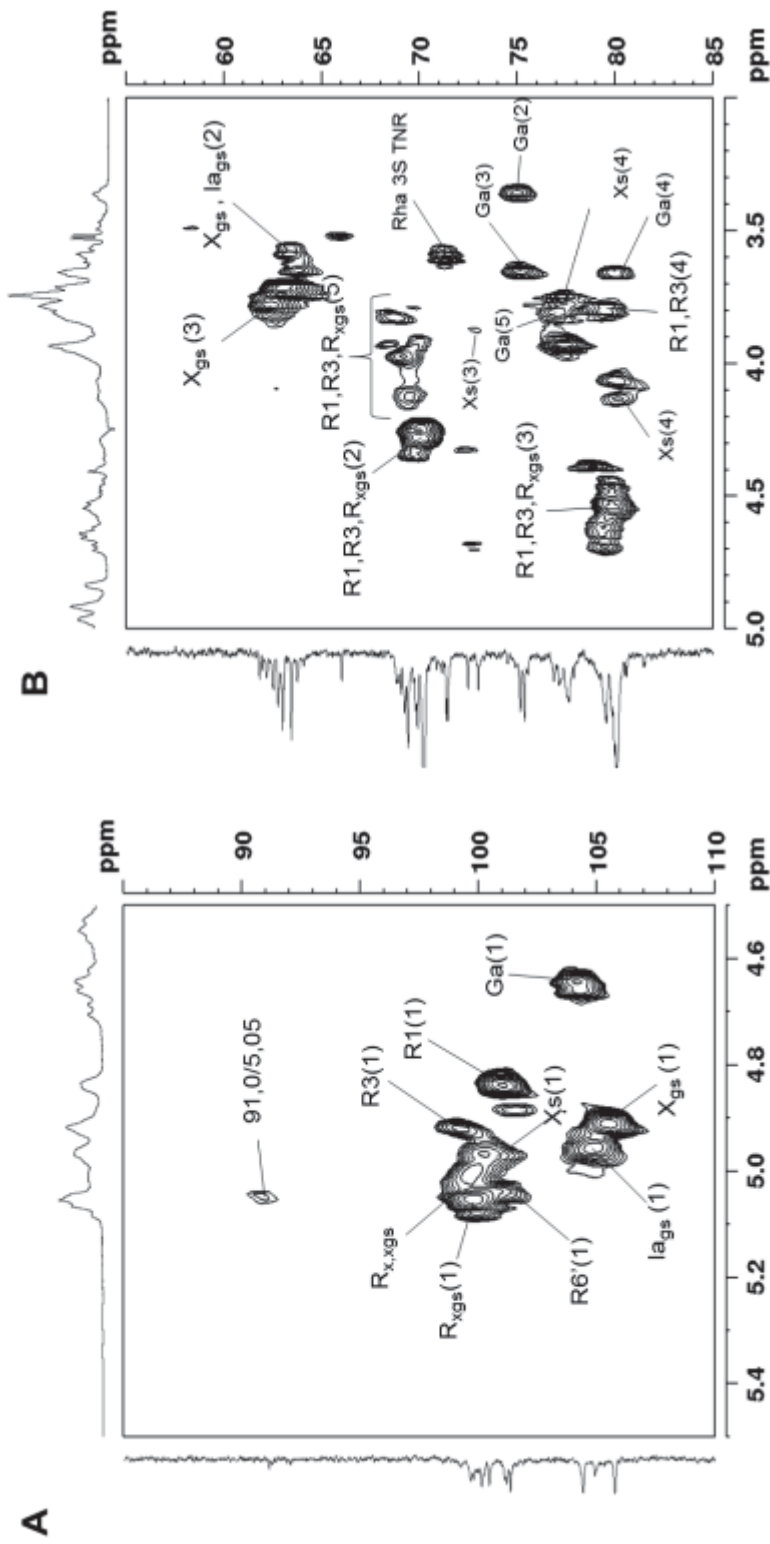
Nota: Solvente = D<sub>2</sub>O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm para <sup>1</sup>H. Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A<sub>3s</sub>; Xs e R3= β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>2s,3s</sub>; Xgs e RXgs = xilose oxidada-reduzida e α-L-ramose 3-sulfato de U<sub>3gs</sub>; lags e R6' = derivado de ácido idurônico oxidado-reduzido e α-L-ramnose 3-sulfato.. Rx,xgs = α-L-ramnose 3-sulfato entre o derivado de xilose oxidado-reduzido e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P2f



Nota: Solvente = D<sub>2</sub>O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm para <sup>1</sup>H. Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A<sub>3s</sub>; Xs = β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>2s,3s</sub>; Xgs e RXgs = xilose oxidada-reduzida e α-L-ramnose 3-sulfato de U<sub>3gs</sub>; lags e R6' = derivado de ácido idurônico oxidado-reduzido e α-L-ramnose 3-sulfato.. Rx,xgs = α-L-ramnose 3-sulfato entre o derivado de xilose oxidado-reduzido e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P3r



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm para  $^{13}\text{C}$  e 2,225 para  $^1\text{H}$ . Ga e R1 =  $\beta$ -D-ácido glucurônico e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{A}_{3\text{s}}$ ; Xs e R3=  $\beta$ -D-xilose 2-sulfato e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato de  $\text{U}_{2\text{s},3\text{s}}$ ; Xgs e  $\text{RX}_{\text{gs}}$  = xilose oxidada-reduzida e  $\alpha$ -L-ramose 3-sulfato de  $\text{U}_{3\text{gs}}$ ; lags e R6' = derivado de ácido idurônico oxidado-reduzido e  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato..  $\text{Rx,xgs}$  =  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato entre o derivado de xilose oxidado-reduzido e  $\beta$ -D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

Nos espectros de HSQC dos produtos após a oxidação com  $\text{NaIO}_4$  por 24, 48 e 72 h seguido por redução com  $\text{NaBH}_4$  (frações P1r, P2r e P3r respectivamente) foi possível identificar as correlações referentes ao C-1/H-1 das unidades de  $\beta$ -D-ácido glucurônico e  $\beta$ -D-Xylp-2-sulfato em 104,4/4,64 e 100,5/4,97 ppm, bem como das unidades de  $\alpha$ -L-Rhap-3-sulfato adjacentes a essas unidades em 101,1/4,82 e 99,3/4,92 ppm. Portanto, as frações P1r, P2r e P3r apresentam as díades  $A_{3s}$  e  $U_{2's,3s}$  (figuras 19 - 24 e tabela 4).

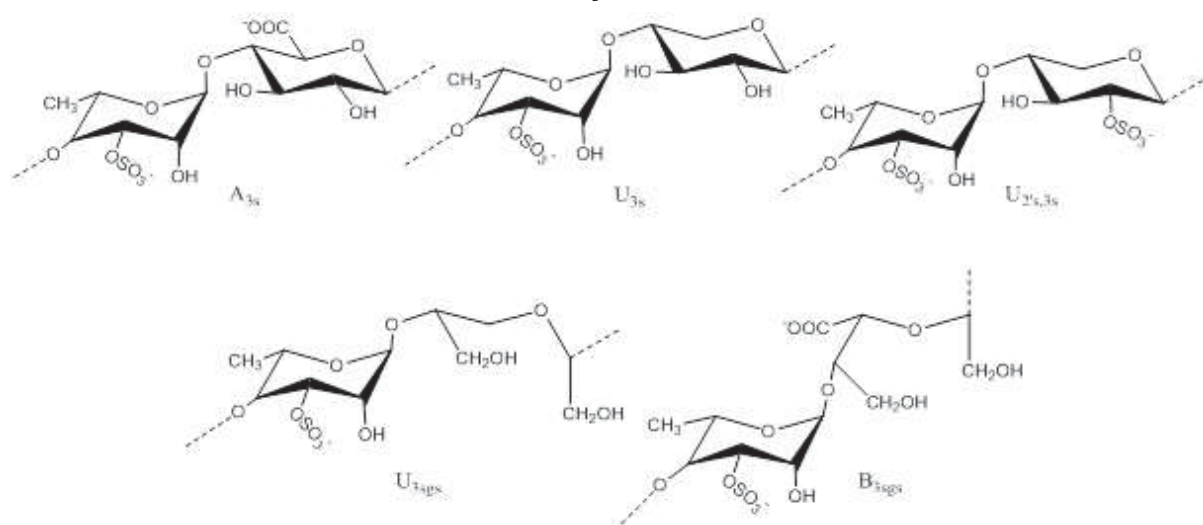
Nestes espectros a correlação 105,8/4,91 ppm foi atribuída ao C-1/H-1 dos derivados de xilose oxidada e reduzida, enquanto a correlação em 100,1/5,06 ppm foi atribuída às unidade  $\alpha$ -L-Rhap-3-sulfato adjacente a esta unidade, formando uma nova díade a partir destes derivados que foi denominada  $U_{3sgs}$ . Já a correlação em 99,8/5,02 ppm foi atribuída à unidade de  $\alpha$ -L-Rhap-3-sulfato entre xilose oxidada e reduzida e  $\beta$ -D-Xylp-2-sulfato. (Carvalho, 2017).

Os sinais de C1/H1 em 105,0/4,96 ppm correspondem aos derivados de ácido idurônico oxidado e reduzido, e os em 101,2/5,05 e 101,1/5,00 referentes C-1/H-1 das unidades de  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato confirmam a presença da díade  $B_{3sgs}$ . Para o espectro da heparina oxidada-reduzida a correlação referente aos C-1/H-1 do derivados de ácido idurônico oxidado e reduzido foi assinalada em 106,9/4,94-4,98 ppm (ALEKSEEVA *et al.*, 2014).

Nos espectros de HSQC das frações P1r, P2r e P3r está ausente a correlação de C1/H1 em 103,8/4,86 ppm previamente atribuída à presença dos derivados de ácido glucurônico oxidado e reduzido (CARVALHO, 2017). Este resultado sugere que no presente trabalho as unidades de ácido glucurônico não foram oxidadas e, se foram estão em baixa percentagem que não podem ser detectadas por RMN.

No espectro de HSQC (figura 24A) da fração P3r, a correlação em 91,0/5,05 ppm indica que parte dos grupos aldeído não foram totalmente reduzidos com  $\text{NaBH}_4$ , demonstrando a presença de grupos aldeído mais resistentes à redução. Estes grupos possivelmente se encontram na forma de hemiacetal cíclico, os quais podem ser formados entre o grupo aldeído de uma unidade oxidada e a hidroxila da unidade não oxidada vizinha. Hemiacetais cíclicos geralmente são mais estáveis quando comparado com os aldeídos livres: isto acontece quando o grupo OH e o grupo carbonila fazem parte da mesma estrutura por meio de uma reação de adição intramolecular.

TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1r, P2r E P3r.



Diáde	Unidade	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
<b>A<sub>3s</sub></b>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→	101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
	4)-β-D-GlcpA-(1→]	104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
<b>U<sub>3s</sub></b>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→	98,9/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,2/4,05	~18,2/1,33
	4)-β-D-Xylp-(1→]	104,8/4,64	74,8/3,35	75,3/3,65	75,5/3,65	n.i.	n.i.
<b>U<sub>2's,3s</sub></b>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→	99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	n.i.	n.i.
	4)-β-D-Xylp-2S-(1→]	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,65	n.i.	n.i.
<b>U<sub>3sgs</sub></b>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→	101,1/5,06	70,4/3,58	79,4/4,63	n.i.	n.i.	n.i.
	4)-β-D-Xyl-2,3OH-(1→]	105,8/4,91	63,8/3,58	63,0/3,75	77,8/3,94	n.i.	n.i.
<b>B<sub>3sgs</sub></b>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→	101,2/5,05	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	4)-α-L-IdoA-2,3OH-1→]	105,0/4,96	63,8/3,65	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i.: Não identificado.

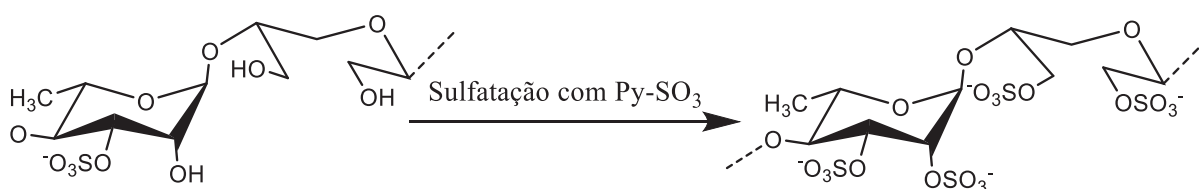
As análises de RMN nas frações P1r, P2r e P3r sugerem que as ulvanas dialdeídicas reduzidas presentes são formadas pelas díades: A<sub>3s</sub>, U<sub>2's,3s</sub>, U<sub>3sgs</sub>, B<sub>3sgs</sub>.

#### 4.5 SULFATAÇÃO DE ULVANAS DIALDEÍDICAS REDUZIDAS P1r, P2r E P3r

A sulfatação de ulvanas dialdeídicas reduzidas das frações P1r, P2r e P3r visaram a obtenção de novos produtos com a inserção de grupos sulfato em hidroxilas primárias e secundárias. Foram sulfatadas com complexo piridina enxofre (Py-SO<sub>3</sub>), originado as frações P1r-S, P2r-S e P3r-S

A ocorrência da reação de sulfatação foi confirmada através de análises químicas e comparação dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H, COSY, TOCSY, HSQC e HMBC, que serão apresentados no decorrer deste tópico.

FIGURA 25 - SULFATAÇÃO DOS DERIVADOS DE ULVANAS OBTIDOS APÓS REDUÇÃO COM NaBH<sub>4</sub>



##### 4.5.1 Análises químicas das ulvanas dialdeídicas reduzidas e sulfatadas P1r-S, P2r-S e P3r-S

O rendimento e as análises químicas das frações P1r-S, P2r-S e P3r-S, com relação a P1r, P2r e P3r, estão representados na tabela 6. O material recuperado, com relação ao material inicial submetido à redução foi de 97,0, 120,0 e 125 % para P1r-S, P2r-S e P3r-S, respectivamente. A fração nativa F2 foi submetida a sulfatação juntamente com as frações reduzidas para obtenção da fração F2-S com rendimento de 117,0%, essa fração foi utilizada pra comparação da atividade anticoagulante com as demais frações. O rendimento da reação de sulfatação foi superior a 100% devido a inserção de grupos sulfato na molécula evidenciados pelo aumento do teor de sulfato, assim como para as frações P1r-S, P2r-S e P3r-S.

A análise de carboidratos totais mostrou uma diminuição no teor da fração nativa F2 de 71,1% para 34% fração F2-S. Foi observado também nas demais frações uma diminuição nos teores carboidratos totais de 46,3, 44,5 e 43,2% P1r, P2r e P3r, respectivamente, para 26,3, 28,3 e 24,3 % P1r, P2r e P3r, respectivamente. Os

resultados apresentaram uma redução entre 43 e 80 % nos teores de carboidratos encontrados após a sulfatação o que poderia ser ocasionado por hidrólises decorrentes da ação do agente sulfatante durante a reação de sulfatação.

A determinação colorimétrica de ácidos urônicos mostrou que houve uma diminuição no teor de ácidos urônicos da fração F2 de 19,1% para 10,1% fração F2-S, para as demais frações de 14,0, 13,9 e 12,7% P1r, P2r e P3r, respectivamente, para 8,6, 8,0 e 6,7 % P1r-S, P2r-S e P3r-S, respectivamente. Os valores de ácidos urônicos tiveram uma redução entre 52 a 62 %.

Os teores de grupo sulfato das frações aumentaram com relação ao teor encontrado em F2 de 18,4% para 50,2% fração F2-S, e para as demais frações de 18,0, 18,1 e 17,4% P1r, P2r e P3r, respectivamente, para 51,9, 43,4 e 43,7 % P1r-S, P2r-S e P3r-S, respectivamente. Este resultado demonstra que a reação de sulfatação foi efetiva com um aumento de 147 a 170% nos teores de sulfato das frações analisadas. Todos os produtos obtidos após sulfatação apresentaram teor de proteínas abaixo de 4%.

TABELA 6 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES P1r-S, P2r-S e P3r-S E DE SUAS FRAÇÕES DE ORIGEM P1r, P2r e P3r

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) <sup>a</sup>	Ácidos urônicos (%) <sup>b</sup>	Sulfato (%) <sup>c</sup>	Proteínas (%) <sup>d</sup>
F2	10,0 <sup>e</sup>	71,1	19,2	18,4 <sup>h</sup>	3,7
F2 - S	117 <sup>g</sup>	34,0 <sup>g</sup>	10,1	50,2 <sup>h</sup>	3,7
P1r	97,0 <sup>f</sup>	46,3	14	18,0 <sup>h</sup>	3,3
P1r - S	120 <sup>g</sup>	26,3 <sup>g</sup>	8,6	51,9 <sup>h</sup>	2,3
P2r	89,6 <sup>f</sup>	44,5	13,9	18,1 <sup>h</sup>	3,1
P2r - S	100 <sup>g</sup>	28,3 <sup>g</sup>	8,0	43,4 <sup>h</sup>	2,2
P3r	99,3 <sup>f</sup>	43,3	12,7	17,4 <sup>h</sup>	3,5
P3r - S	125 <sup>g</sup>	24,3 <sup>g</sup>	6,7	43,7 <sup>h</sup>	2,3

<sup>a</sup>Dubois *et al.*, 1956. <sup>b</sup>Filiseti-Cozzi; Carpita, 1991. <sup>c</sup>Dodgson; Price, 1962. <sup>d</sup>Lowry *et al.*, 1951. <sup>e</sup>Em relação à alga seca e moída. <sup>f</sup>Material recuperado após a redução com borohidreto. <sup>g</sup>Material recuperado após a sulfatação com complexo piridina enxofre. <sup>h</sup>Na forma de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>



#### 4.5.2 Análises de RMN das ulvanas dialdeídicas reduzidas e sulfatadas P1r-S, P2r-S e P3r-S

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figuras 26 – 28) das frações sulfatadas P1r-S, P2r-S e P3r-S apresentaram de novos sinais devido a introdução de grupos sulfato em C-2 de unidades de  $\alpha\text{-L-Rhap-3-sulfato}$ . Foram observados o aumento de sinais em 76,1 – 77,6 ppm (C-2 de  $\alpha\text{-L-Rhap-2,3-dissulfato 4-ligada}$ ), com concomitante decréscimo do sinal em 70,4 ppm (C-2 de  $\alpha\text{-L-Rhap-3-sulfato 4-ligada}$ ). Adicionalmente os espectros apresentaram novos sinais na região anomérica do espectro em 98,8, 98,6 e 98,4 de  $\alpha\text{-L-Rhap-2,3-dissulfato 4-ligada}$  e C-3 em 77,0 ppm, esses sinais estão deslocados em alto campo quando comparados a C-1 (101,1, 99,3 e 98,9 ppm) e C-3 (78,5 – 79,4 ppm) de unidades de  $\alpha\text{-L-Rhap-2,3-dissulfato 4-ligada}$  (FREITAS et al., 2015).

A sulfatação das unidades de  $\beta\text{-D-Xylp 4-ligadas}$  foi observada nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  pelo aparecimento dos sinais em 80,1 e 78,5 ppm correspondentes a C-2 e C-3, da  $\beta\text{-D-Xylp-2,3-dissulfato 4-ligadas}$  respectivamente e o concomitante desaparecimento dos sinais a 74,8 e 75,3 ppm (C-2 e C-3, respectivamente, das unidades de  $\beta\text{-D-Xylp 4-ligadas}$  não sulfatadas). Estas atribuições foram feitas considerando os efeitos simultâneos de deslocamento  $\alpha$  e  $\beta$  nos carbonos C-2 e C-3 após a sulfatação. O aparecimento do sinal em 59,1 ppm correspondente a C-5 das unidades de  $\beta\text{-D-Xylp-2,3-dissulfato}$  identificada a partir de dados da literatura (DAUS et al., 2011; CHENG et al., 2016).

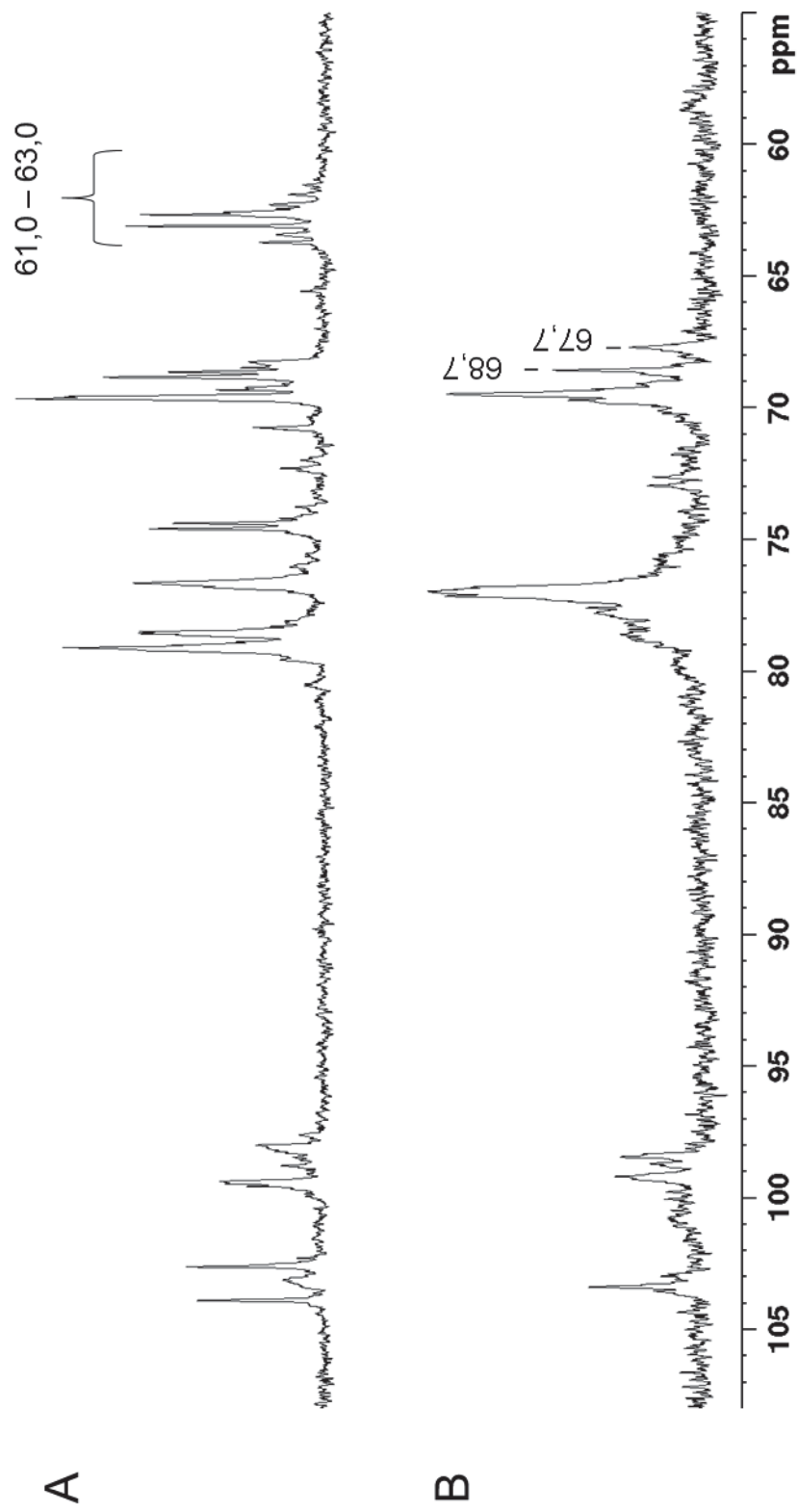
O desaparecimento dos sinais na região 61 – 63 ppm foi observado com um aumento da intensidade dos sinais na região de 67 – 68 ppm, correspondendo a O-sulfatação de grupos hidroxila primários (KOVENSKY; CIRELLI, 1996). Devido ao fato de serem gerados novos grupos hidroxila primários a partir da oxidação e redução houve o surgimento de novas díades após a sulfatação:  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-2,3S-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl-2,3OS-(1}\rightarrow ]$  e  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-2,3S-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA-2,3OS-1}\rightarrow ]$

A região anomérica dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou a desaparecimento do sinal em 104,4 ppm correspondendo ao ácido  $\beta\text{-D-glucurônico 4-ligado}$  não sulfatado e concomitante surgimento de novo sinal em 103,4 ppm atribuído ao ácido  $\beta\text{-D-glucurônico 2,3-dissulfato}$ . A sulfatação de C-2 e C-3 também é observada na

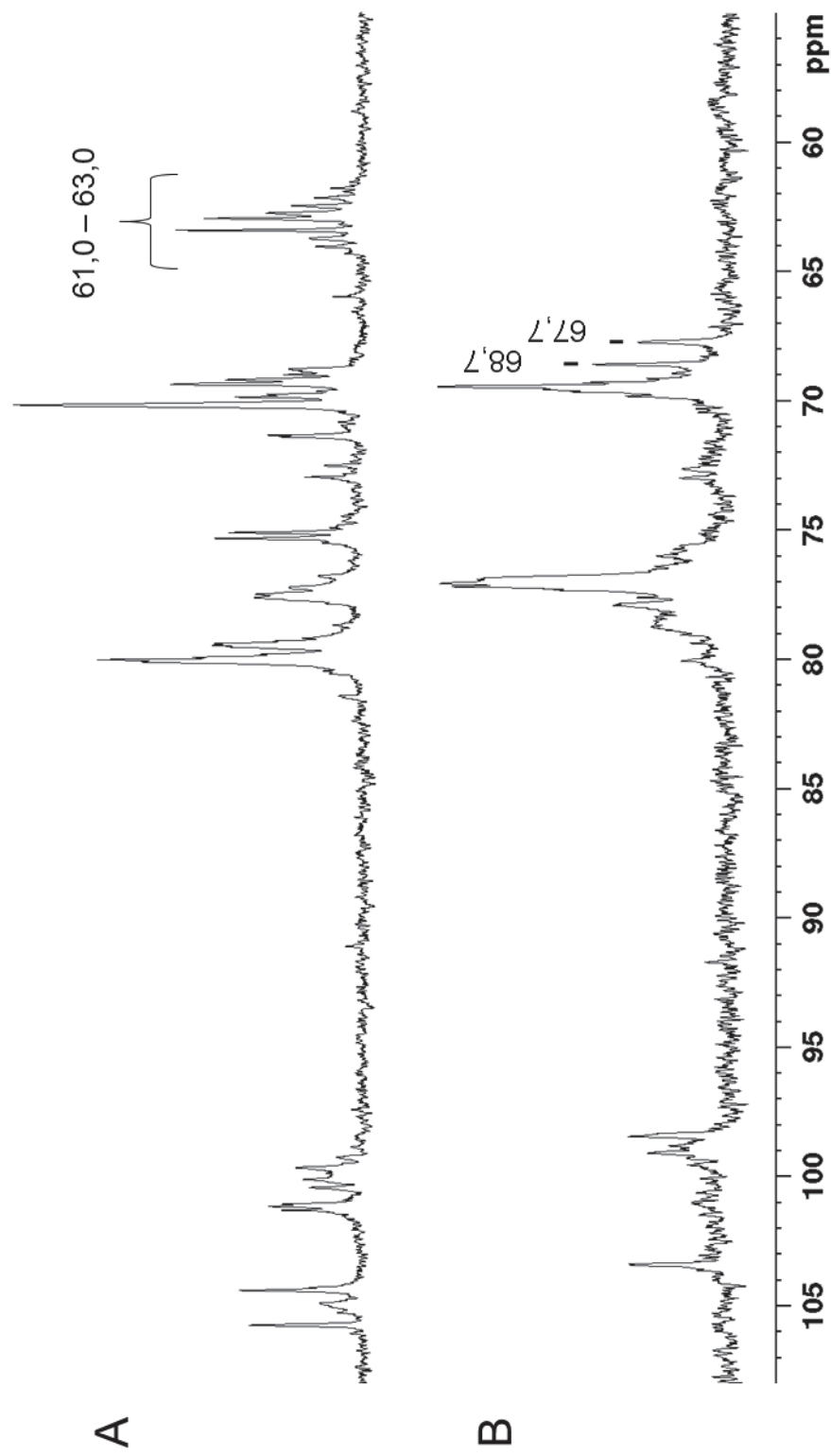
região do anel dos espectros devido ao desaparecimento dos sinais em 75,1 e 75,3 ppm (C-2 e C-3 de das unidades ácido glucurônico, respectivamente).

A sulfatação química das frações P1r-S, P2r-S e P3r-S também foi verificada nos respectivos espectros do HSQC (figuras 29 – 31). Nas regiões anoméricas, a presença das novas correlações a 98,8/5,24, 98,4/5,28, e 98,6/5,38 ppm foram atribuídas unidades de  $\alpha$ -L-Rhap-2,3-dissulfato 4-ligada constituintes das diferentes díades presentes no polissacarídeo. Além disso, a nova correlação a 103,4/5,10 ppm corresponde a C1 unidades de ácido glucurônico 2,3-sulfato 4-ligadas.

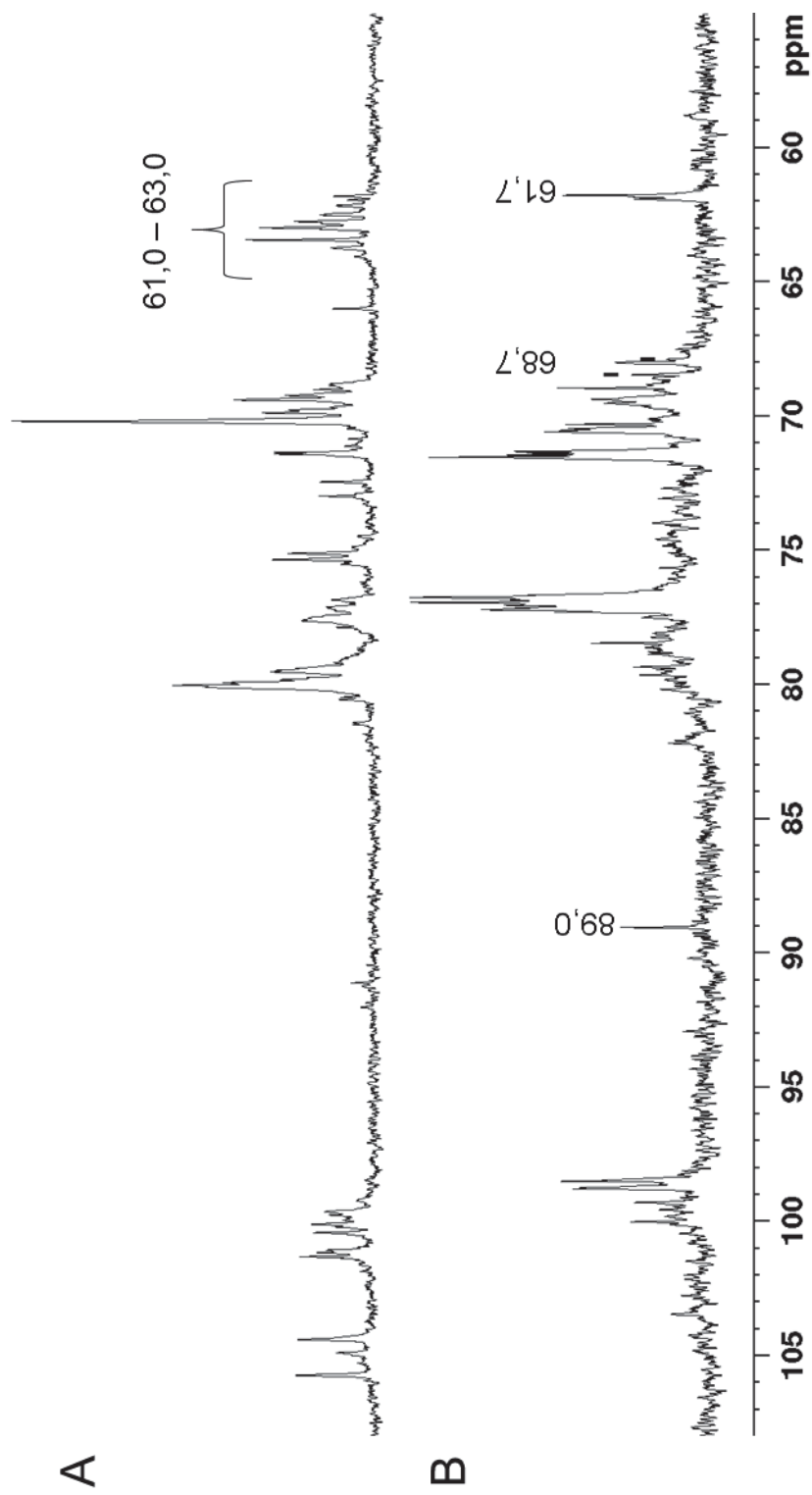
Nos espectros de  $^{13}\text{C}$  e HSQC da fração P3r-S foram observados a presença de um sinal em 89,0 ppm o qual foi atribuído à presença de hemiacetais nesta fração, entre C-2 de unidades de  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato e C-3 de unidades de xilose oxidadas resistentes a redução com borohidreto. No espectro de HSQC a correlação de 71,5/3,97 ppm foi atribuída à sulfatação de C-2 da unidade de xilose oxidada adjacente ao hemiacetal formado. Ainda foi possível observar que não há mudança em C-2 de  $\alpha$ -L-ramnose 3-sulfato como o observado nos demais espectros.

FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES P1r (A) E P1r-S (B)

Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

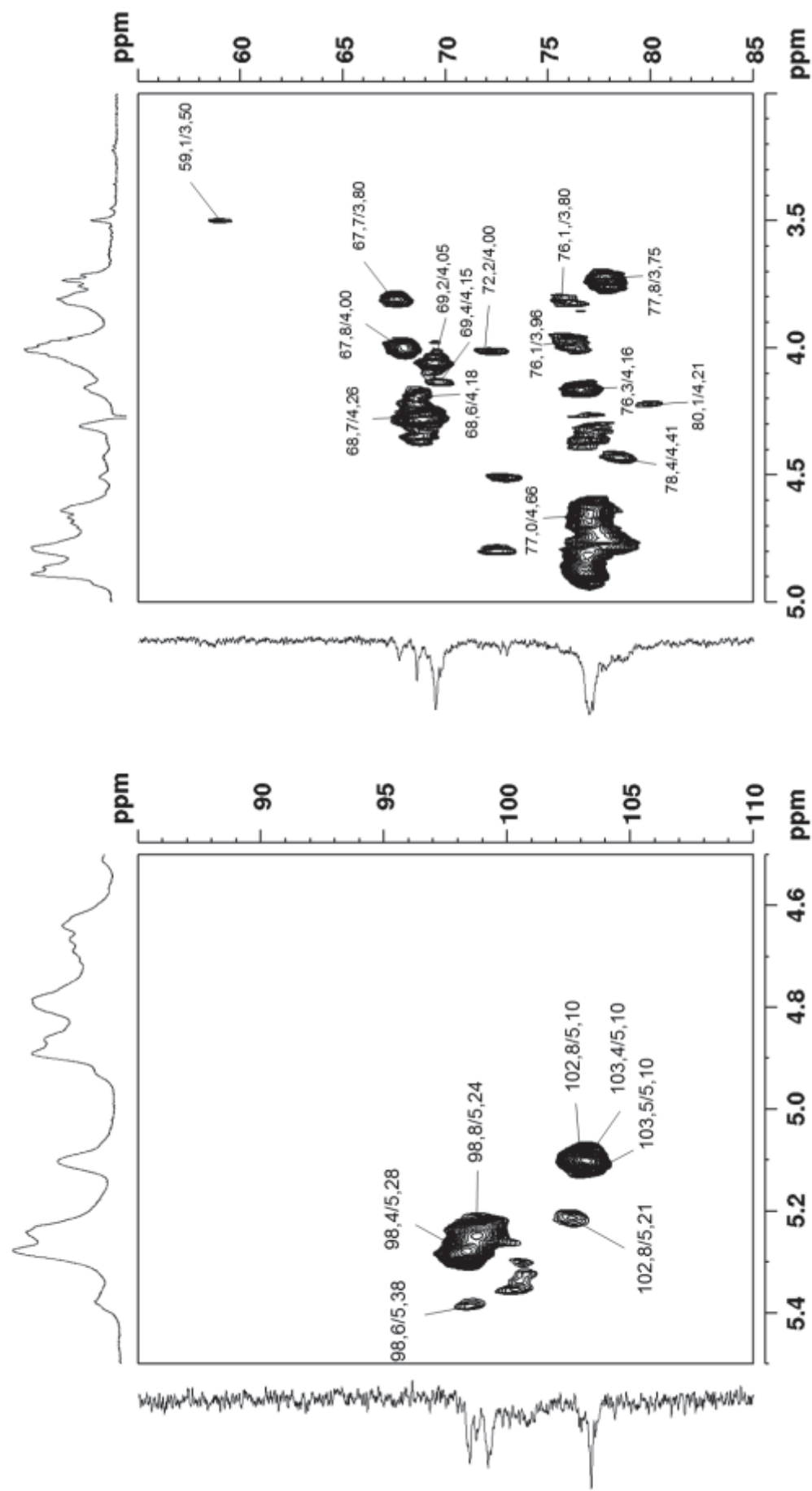
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES P2r (A) E P2r-S (B)

Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES P3r (A) E P3r-S (B)

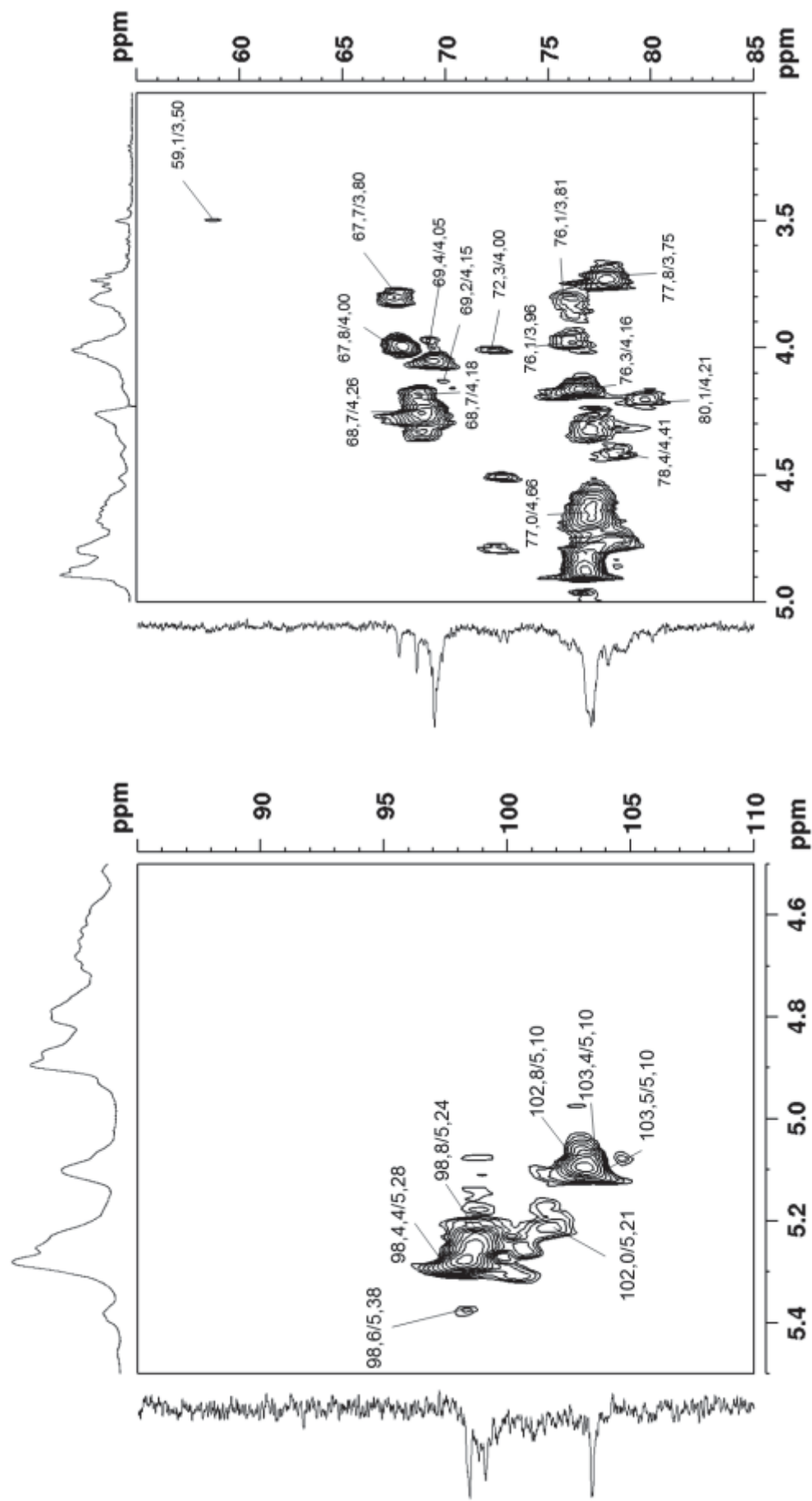
Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DE P1r-S



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm para  $^{13}\text{C}$  e 2,225 para  $^1\text{H}$ .

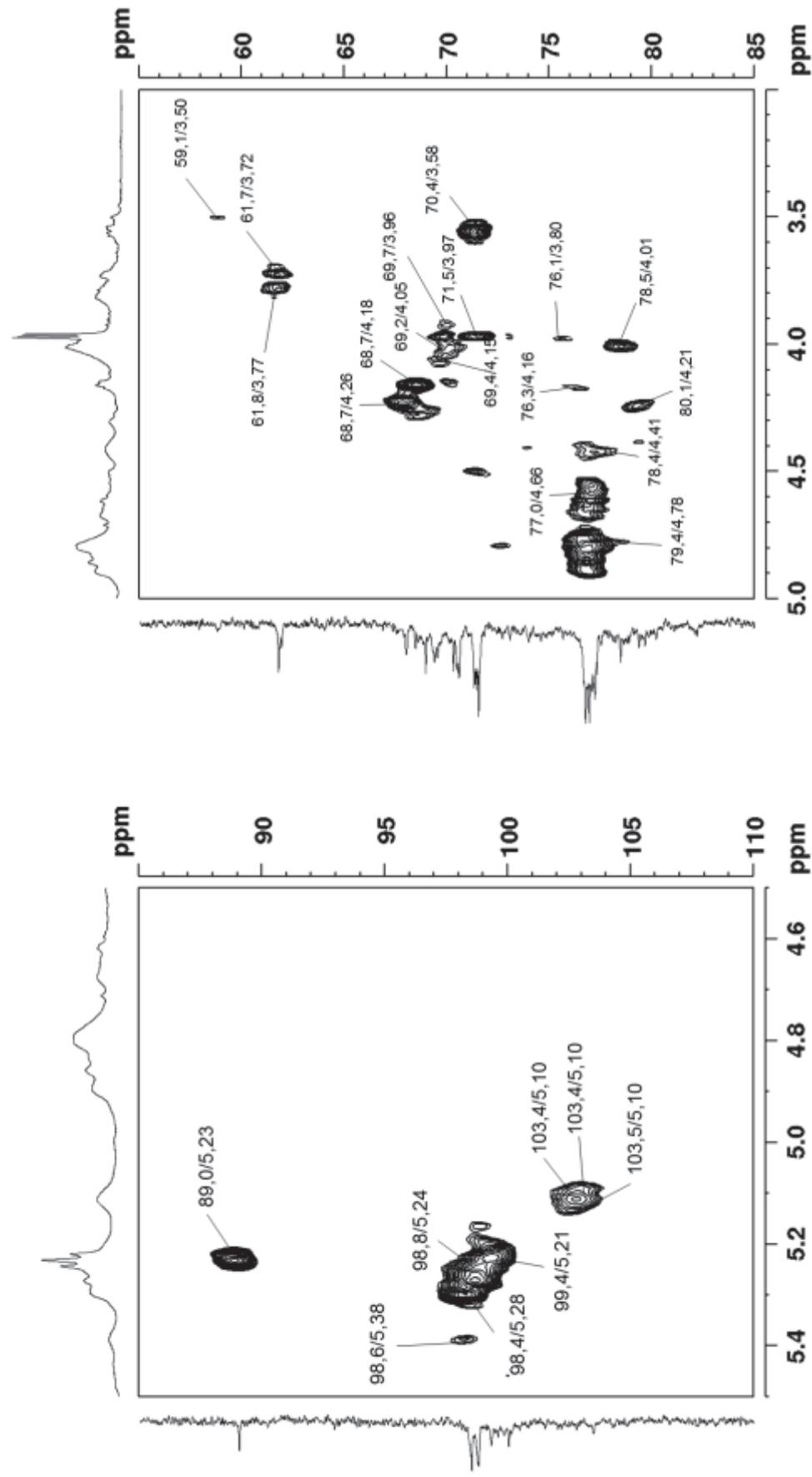
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P2r-S



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm para  $^{13}\text{C}$  e 2,225 ppm para  $^1\text{H}$ .

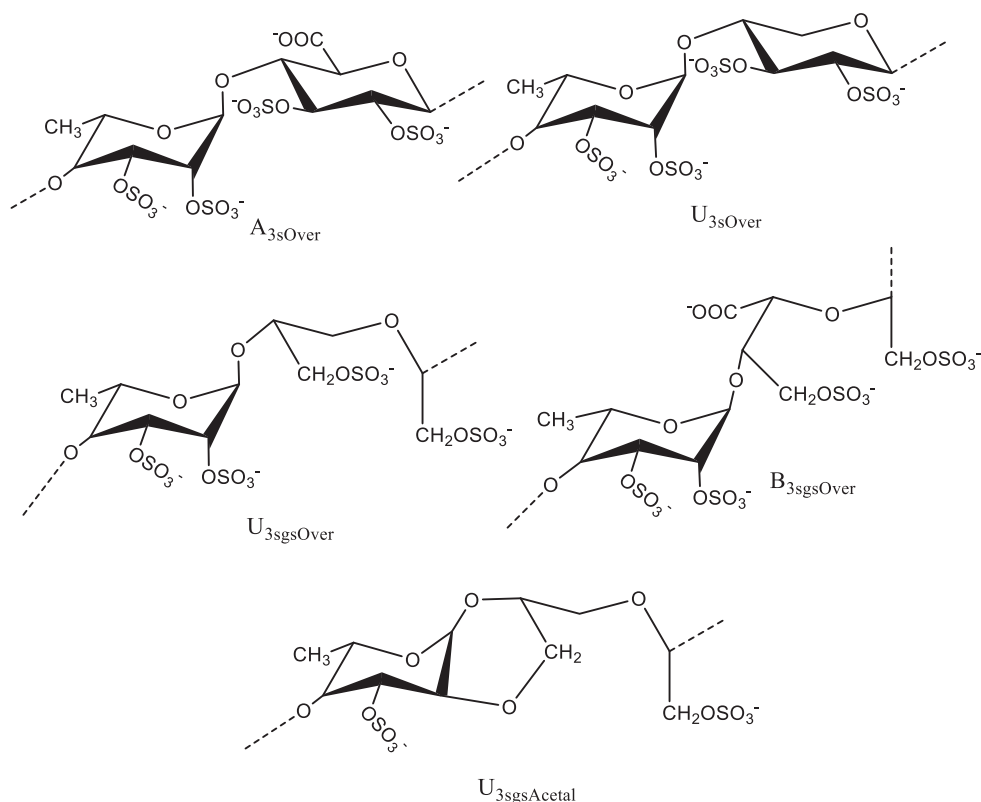


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P3r-S



Nota: Solvente =  $\text{D}_2\text{O}$ . Temperatura =  $70^\circ\text{C}$ . Calibrado com acetona em 31,45 ppm para  $^{13}\text{C}$  e 2,225 ppm para  $^1\text{H}$ .

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1R-S, P2R-S E P3R-S



Díade	Unidade	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
<b>A<sub>3sOver</sub><sup>a,b,c</sup></b>	[→4)-α-L-Rhap-2,3S-(1→	98,6/5,38	76,3/4,16	77,0/4,66	77,8/3,75	69,4/4,15	~18,3/1,40
	4)-β-D-GlcpA-2,3S-(1→]	103,4/5,10	72,3/4,00	76,7/4,16	n.i.	77,0/3,79	~175,3
<b>U<sub>3sOver</sub><sup>a,b,c</sup></b>	[→4)-α-L-Rhap-2,3S-(1→	98,4/5,28	76,3/4,16	77,0/4,66	77,8/3,75	69,2/4,05	~18,3/1,40
	4)-β-D-Xylp-2,3-(1→]	102,8/5,21	80,1/4,21	78,4/4,41	n.i.	59,1/3,50	
<b>U<sub>3sgsOver</sub><sup>a,b</sup></b>	[→4)-α-L-Rhap-2,3S-(1→	98,6/5,38	76,3/4,16	77,0/4,66	n.i.	n.i.	~18,3/1,40
	4)-β-D-Xyl-2,3OS-(1→]	103,5/5,10	67,8/3,98	67,7/3,80	n.i.	n.i.	n.i.
<b>B<sub>3sgsOver</sub><sup>a,b,c</sup></b>	[→4)-α-L-Rhap-2,3S-(1→	98,8/5,24	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	~18,3/1,40
	4)-α-L-IdoA-2,3OS-(1→]	102,8/5,10	68,8/4,26	68,7/4,18	n.i.	n.i.	~175,3
<b>U<sub>3sgsAcetal</sub><sup>c</sup></b>	[→4)-α-L-Rhap-3S-(1→	98,6/5,38	70,4/3,58	79,4/4,78	n.i.	n.i.	~18,3/1,40
	4)-β-D-Xyl-2-OS-(1→]	99,4/5,21	71,4/3,97	89,0/5,23	n.i.	n.i.	n.i.

<sup>a,b,c</sup>Presente nas frações P1r-S, P2r-S e P3r-S, respectivamente. n.i. não identificado.

As análises de RMN nas frações P1r-S, P2r-S e P3r-S sugerem que as ulvanas dialdeídicas reduzidas e sulfatadas presentes são formadas pelas díades:

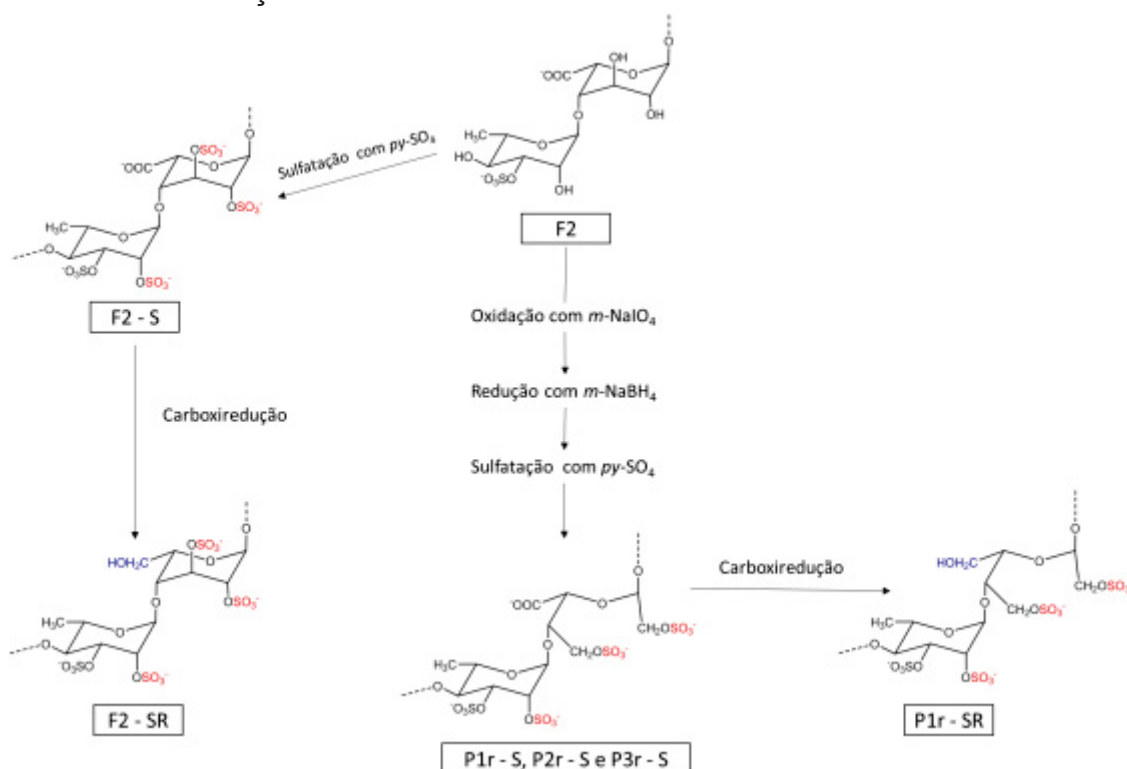
A<sub>3sOver</sub>, U<sub>3sOver</sub>, U<sub>3sgsOver</sub> e B<sub>3sgsOver</sub>.

#### 4.6 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS ULVANAS NATIVAS E MODIFICADAS

A atividade anticoagulante de ulvanas nativas presentes em F2 e de seus produtos modificados quimicamente foi realizada através dos ensaios de coagulação APTT (Tempo de tromboplastina parcial ativada), PT (Tempo de protrombina) e TT (Tempo de trombina).

As frações utilizadas para estes testes estão representadas na figura 23.

FIGURA 23 - FRAÇÕES UTILIZADAS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE



NOTA: A figura representa a modificação química das unidades de ácido idurônico da díade B<sub>3s</sub>

O método de carboxirredução, foi utilizada para comparar a atividade anticoagulante sem a interferência de grupos carboxila, tendo em vista que Carvalho et al. 2018, realizou oxidação via periodato-clorito para obtenção de ulvanas policarboxílicas demonstrando assim a importância dos grupos carboxila no aumento da atividade anticoagulante.

#### 4.6.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) para ulvanas nativas (F2) e seus produtos modificados

O teste do APTT foi realizado para as frações F2, F2-S, F2-SR, P1r-S, P2r-S, P3r-S e P1r-SR. Este ensaio avalia a via intrínseca da cascata de coagulação através de um substituto plaquetário (cefalina), de um ativador do FXI (cloreto de cálcio) e um fator de contato (caulim ou sílica).

Para a avaliação da atividade anticoagulante foram utilizadas concentrações crescentes das frações citadas (2,5-50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina (1-15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias APTT (s)  $\pm$  DPM e estão listados na tabela 8. Os resultados dos ensaios de APTT da heparina está representada na tabela 9.

TABELA 8 - TESTE DE APTT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Polissacarídeo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )						
	2,5	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	50,0
F2	35,0 $\pm$ 2,1	36,0 $\pm$ 0,7	39,3 $\pm$ 1,7	34,5 $\pm$ 1,1	33,0 $\pm$ 1,9	36,8 $\pm$ 1,3	49,6 $\pm$ 2,3
F2-S	47,7 $\pm$ 2,0	66,0 $\pm$ 1,4	111,5 $\pm$ 3,8	157,1 $\pm$ 0,7	>300,0 $\pm$ 0,0	>300,0 $\pm$ 0,0	>300,0 $\pm$ 0,0
P1r-S	45,9 $\pm$ 1,7	58,5 $\pm$ 2,1	109,3 $\pm$ 2,3	167,3 $\pm$ 1,1	>300,0 $\pm$ 0,0	>300,0 $\pm$ 0,0	>300,0 $\pm$ 0,0
P2r-S	43,5 $\pm$ 1,2	63,2 $\pm$ 0,7	110,2 $\pm$ 1,5	123,3 $\pm$ 4,6	153,0 $\pm$ 1,2	>300,0 $\pm$ 0,0	>300,0 $\pm$ 0,0
P3r-S	44,3 $\pm$ 3,4	50,8 $\pm$ 2,5	90,9 $\pm$ 1,9	87,7 $\pm$ 4,4	120,7 $\pm$ 1,0	137,0 $\pm$ 3,8	>300,0 $\pm$ 0,0
F2-SR	31,5 $\pm$ 0,6	33,2 $\pm$ 0,1	36,6 $\pm$ 0,3	32,6 $\pm$ 0,6	32,9 $\pm$ 1,3	34,7 $\pm$ 1,0	43,8 $\pm$ 2,1
P1r-SR	29,5 $\pm$ 0,5	31,1 $\pm$ 0,6	32,2 $\pm$ 0,6	31,1 $\pm$ 0,9	32,5 $\pm$ 0,1	30,8 $\pm$ 0,3	43,6 $\pm$ 0,9

Resultados expressos em tempo médio (s)  $\pm$  SEM. Salina (30,6  $\pm$  0,6s) foi usada como controle positivo de coagulação

TABELA 9 - TESTE DE APTT PARA A HEPARINA

Fração	Polissacarídeo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	1,0	2,5	5,0	10,0	15,0
Heparina	33,4 $\pm$ 2,1	40,4 $\pm$ 0,1	96,8 $\pm$ 0,8	>300,0 $\pm$ 0,0	>300,0 $\pm$ 0,0

Resultados expressos em tempo médio (s)  $\pm$  DPM. Salina (30,6  $\pm$  0,6s) foi usada como controle positivo de coagulação

A atividade de F2 é baixa quando comparada com a da heparina, a sulfatação da fração (F2), assim como seus produtos previamente oxidados e reduzidos (P1r-S, P2r-S e P3r-S) ocasionou um aumento na atividade anticoagulante. Este resultado está de acordo com a literatura onde o aumento do teor de grupos O-sulfato tem seu efeito frequentemente correlacionado com o aumento na atividade anticoagulante em

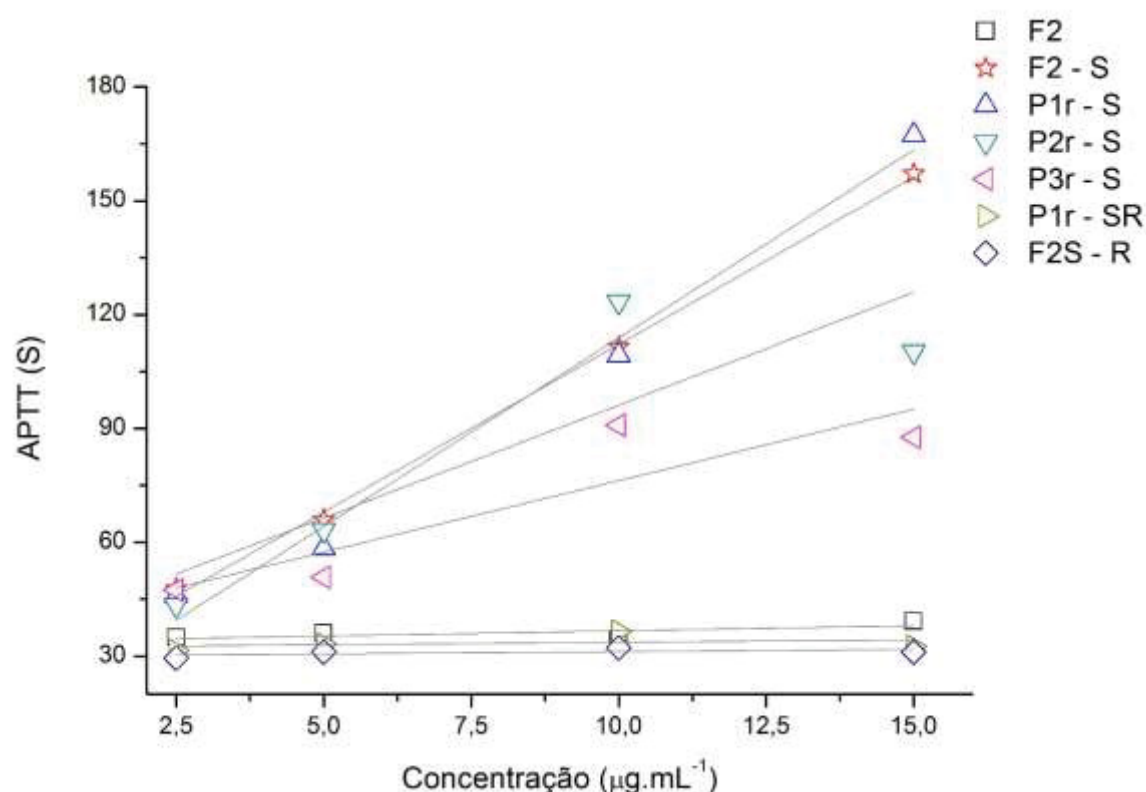
diferentes tipos de polímeros. Como a atividade anticoagulante observada em ulvanas de *U. conglobata* com diferentes teores de grupos O-sulfato (entre 23,0 e 35,2 %), obtidas após fracionamento em coluna DEAE-Sephacel. A fração com maior teor de sulfato prolongou o tempo de coagulação de 40,2 s (salina) para 250 s ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no teste de APTT. Para a fração com menor teor de grupos sulfato para se obter o mesmo tempo de coagulação 250 s no teste de APTT foram necessários  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (MAO et al. 2006).

De modo diferente quando as frações sulfatadas quimicamente F2-S e P1r-S foram submetidas ao processo de carboxiredução (frações F2-SR e P1r-SR, respectivamente), a atividade anticoagulante apresentou forte declínio e retornou aos níveis comparáveis a baixa atividade apresentada pela ulvana nativa F2. Deste modo a presença de grupos COOH se apresentou como essencial para o desempenho da atividade anticoagulante mesmo que os polímeros apresentassem alto teor de grupos sulfato (>50%).

A importância dos grupos COOH foi discutida por Carvalho et al (2018) através da modificação de ulvanas de *U. fasciata* via oxidação periodato-clorito obtendo-se frações com diferentes teores de grupos COOH ( $1,23\text{-}1,81 \text{ mmol.g}^{-1}$ ). A fração com maior teor de grupos COOH ( $1,81 \text{ mmol.g}^{-1}$ ) prolongou o tempo de coagulação de 29,4 s (salina) para 222,0 s ( $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no teste de APTT. Quando esta fração sofreu o processo de carboxiredução, com redução do teor de COOH ( $0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$ ), houve uma forte declínio no tempo de coagulação para 30,8 s ( $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante das ulvanas modificadas, foi plotado um gráfico de APTT em função da concentração, com linha de tendência linear para as frações F2, F2-S, F2-SR, P1r-S, P2r-S P3r-S e P1r-SR.

FIGURA 32 - GRÁFICO DO APTT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLÍMERO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, F2-SR, P1r-S, P2r-S, P3r-S e P1r-SR)



A partir destas curvas foi calculada a equação da reta para cada uma das frações, com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante entre as amostras. As suas equações estão representadas na tabela 10. A partir destas equações foi calculada a concentração necessária para que o polissacarídeo dobre o tempo de coagulação em relação à salina (CN2APTT) (Tabela 10). Esse dado representa a potência do fármaco sendo que quanto menor valor, maior é a potência.

TABELA 10 - EQUAÇÃO DA RETA, CN2APTT E  $\Delta T, \mu\text{g}^{-1}$  DE POLISSACARÍDEO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, P1R-S, P2R-S E P3R-S)

Fração	Equação da reta	CN2APTT ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	$\Delta T, \mu\text{g}^{-1}$ de polissacarídeo (s)
F2	$y = 0,296x + 34,97$ $R^2 = 0,980$	87,8	0,30
F2-S	$y = 8,833x + 23,80$ $R^2 = 0,998$	4,2	8,83
P1r-S	$y = 9,916x + 14,68$ $R^2 = 0,987$	4,7	9,92
P2r-S	$y = 5,900x + 29,77$ $R^2 = 0,985$	5,3	5,90
P3r-S	$y = 4,056x + 34,82$ $R^2 = 0,980$	6,5	4,05

A partir do coeficiente angular da equação da reta é possível determinar a variação no tempo de APTT ( $\Delta T$ ) que é provocada pela adição de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de polissacarídeo.

O ensaio de APTT mostrou que a fração F2 apresenta baixa atividade anticoagulante, a qual é desempenhada a partir de  $87,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , esse valor é obtido a partir dos valores de calculados por CN2APTT.

Os valores de CN2APTT para as frações sulfatadas quimicamente F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S foram de 21,0 a 13,5 vezes menores que a observada para fração nativa F2. As frações com maior teor de grupos sulfato F2-S e P1r-S (50,2 e 51,9 %, tabela 6) foram as que apresentaram maior atividade quando avaliadas pelos valores de CN2APTT ( $4,2$  e  $4,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Embora as frações P2r-S e P3r-S contenham menor teor de grupos sulfato (43,4 e 43,7 %, respectivamente), em comparação com F2-S e P1r-S as mesmas apresentam melhor atividade anticoagulante quando comparados a fração nativa F2 por apresentares os valores de CN2APTT de ( $5,3$  e  $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), enquanto a fração nativa F2 apresenta uma valor de  $87,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As frações P2r-S e P3r-S apresentam valores de 13,5 a 16,6 vezes menores que os apresentados por F2, sendo assim necessária menor dose dessas frações para que ocorra um aumento no tempo de coagulação.

#### 4.6.2 Teste de tempo de protrombina (PT) para ulvanas nativas e modificas

O teste de PT é usado para avaliar a via extrínseca da cascata de coagulação. Para este ensaio, foram selecionadas as frações F2, F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S. Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina ( $1-20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias PT (s)  $\pm$  DPM estão listados na tabela 11. Os resultados dos ensaios de PT para a heparina estão representadas na tabela 12.

As ulvanas nativas (F2) e os produtos obtidos após modificação não apresentaram atividade pelo teste de PT nas dosagens testadas.



TABELA 11 - TESTE DE PT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Polissacarídeo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
F2	$17,7 \pm 0,5$	$16,4 \pm 0,5$	$16,5 \pm 0,4$	$16,3 \pm 0,1$	$16,5 \pm 0,3$
F2-S	$17,1 \pm 0,1$	$16,8 \pm 0,1$	$18,4 \pm 0,3$	$23,5 \pm 0,7$	$70,7 \pm 3,1$
P1r-S	$15,7 \pm 0,5$	$16,4 \pm 0,8$	$17,3 \pm 1,8$	$29,7 \pm 2,9$	$47,5 \pm 1,1$
P2r-S	$16,3 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,4$	$17,6 \pm 0,1$	$24,0 \pm 1,7$	$50,9 \pm 2,4$
P3r-S	$16,1 \pm 0,2$	$16,6 \pm 0,2$	$18,2 \pm 0,5$	$19,2 \pm 0,7$	$24,3 \pm 0,5$

Resultados expressos em tempo médio (s)  $\pm$  DPM. Salina ( $15,0 \pm 0,1$  s) foi usada como controle positivo de coagulação

TABELA 12 - TESTE DE PT PARA A HEPARINA

Fração	Polissacarídeo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	2,5	5,0	15,0	20,0	30,0
Heparina	$15,9 \pm 0,4$	$18,1 \pm 0,5$	$22,8 \pm 0,3$	$47,5 \pm 1,0$	$>100,0 \pm 0,0$

Resultados expressos em tempo médio (s)  $\pm$  DPM. Salina ( $15,0 \pm 0,1$  s) foi usada como controle positivo de coagulação

#### 4.6.3 Teste de tempo de trombina (TT) para as ulvanas nativas e modificadas

O teste de tempo de trombina (TT) avalia o tempo necessário para que a trombina converta a fibrina em fibrinogênio. Esta é a última etapa da cascata de coagulação sanguínea. Para este ensaio, foram selecionadas as frações F2, F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S em concentrações crescentes de ( $5-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina ( $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias TT (s)  $\pm$  DPM e estão listados na tabela 13. Os resultados dos ensaios TT para a heparina estão representados na tabela 14.

TABELA 13 - TESTE DE TT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Polissacarídeo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
	5,0	10,0	25,0	50,0
F2	$28,8 \pm 0,9$	$27,6 \pm 0,7$	$26,7 \pm 1,3$	$24,3 \pm 1,0$
F2-S	$32,1 \pm 0,4$	$32,3 \pm 0,8$	$56,8 \pm 3,3$	$>100 \pm 0,0$
P1r-S	$35,1 \pm 0,5$	$34,1 \pm 0,8$	$52,1 \pm 1,8$	$>100 \pm 0,0$
P2r-S	$37,0 \pm 1,0$	$36,6 \pm 0,6$	$56,2 \pm 2,0$	$>100 \pm 0,0$
P3r-S	$30,1 \pm 0,8$	$30,9 \pm 0,2$	$46,7 \pm 1,5$	$52,7 \pm 2,4$

Resultados expressos em tempo médio (s)  $\pm$  DPM. Salina ( $33,0 \pm 1,0$  s) foi usada como controle positivo de coagulação.

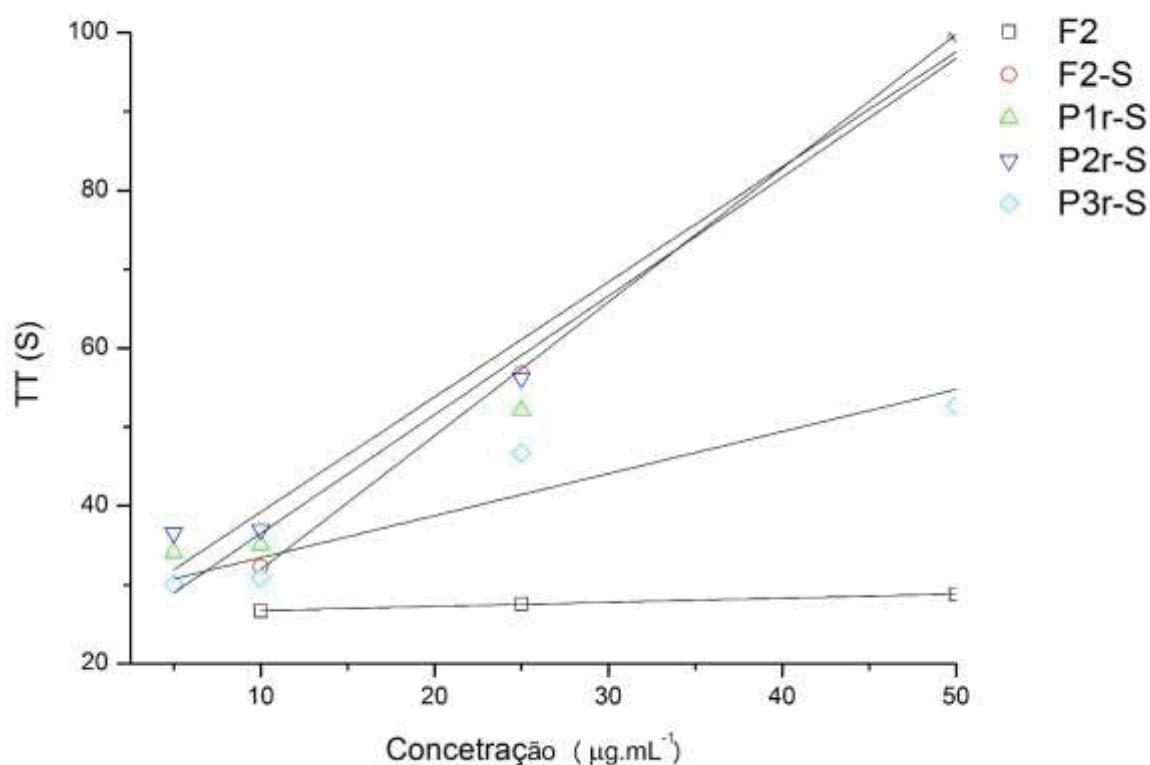
TABELA 14 - TESTE DE TT PARA A HEPARINA

Fração	Polissacarídeo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
	1	2,5	5,0	10,0
Heparina	$29,1 \pm 1,3$	$29,5 \pm 0,9$	$>100 \pm 0,0$	$>100 \pm 0,0$

Resultados expressos em tempo médio (s)  $\pm$  DPM. Salina ( $33,0 \pm 1,0$  s) foi usada como controle positivo de coagulação

Com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante das ulvanas modificadas, foi plotado um gráfico de TT em função da concentração, com linha de tendência linear para as frações F2, F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S

FIGURA 33 - GRÁFICO DO TT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLÍMERO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S)



A partir destas curvas foi calculada a equação da reta para cada uma das frações, com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante entre as amostras. Estas equações estão representadas na tabela 15. A partir desta equação foi calculada a concentração necessária para que o polissacarídeo dobre o tempo de coagulação em relação à salina (CN2TT) (Tabela 15). Esse dado representa a potência do fármaco sendo que e quanto menor valor, maior é a potência.

Os resultados mostraram que as frações F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S apresentam prolongam o tempo de trombina quando comparada com a fração de origem F2. Dentre estas frações, as frações, que possui maior teor de grupos sulfato,

apresentou menor CN2TT, ou seja, as frações sulfatadas tiveram sua atividade aumentada no teste de TT.

TABELA 15 - EQUAÇÃO DA RETA, CN2TT, E  $\Delta T$ . $\mu g^{-1}$  DE POLISSACARÍDEO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS (F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S)

Fração	Equação da reta	CN2TT ( $\mu g.mL^{-1}$ )	$\Delta T$ . $\mu g^{-1}$ de polissacarídeo (s)
F2	$y = 0,052x + 26,23$ $R^2 = 0,996$	764,9	0,05
F2-S	$y = 1,696x + 14,98$ $R^2 = 0,999$	30,1	1,70
P1r-S	$y = 1,506x + 21,44$ $R^2 = 0,969$	29,6	1,50
P2r-S	$y = 1,459x + 24,62$ $R^2 = 0,978$	28,4	1,45
P3r-S	$y = 0,533x + 28,11$ $R^2 = 0,8995$	71,1	0,53

A partir do coeficiente angular da equação da reta é possível determinar a variação no tempo de TT ( $\Delta T$ ) que é provocada pela adição de 1  $\mu g$  de polissacarídeo. Assim como observado para a CN2TT, as frações que apresentaram maior atividade foram F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S. Dentre estas frações, a fração F2-S ocasionou uma maior variação no tempo de TT.

Como consequência da sulfatação química seja da fração de ulvanas nativas (F2-S) ou das frações modificadas quimicamente via oxidação, redução e sulfatação (P1r-S, P2r-S e P3r-S), estas apresentaram maior atividade no teste de TT que a ulvana nativa. Esses resultado difere dos encontrados para ulvanas policarboxílicas por Carvalho et al.,2018 as quais não apresentaram atividade no teste de TT. A presença de novos grupos sulfato pode ocasionar uma ação direta ou indireta na trombina, o que não ocorre em ulvanas policarboxílicas.

## 4.7 PROPRIEDADES MACROMOLECULARES DAS ULVANAS NATIVAS E DE SEUS PRODUTOS OBTIDOS APÓS A SULFATAÇÃO

A sulfatação das ulvanas nativas e oxidadas-reduzidas originou novos biopolímeros com um alto caráter iônico devido à inserção de novos grupos sulfato. Estes novos produtos apresentaram uma maior atividade anticoagulante quando comparado com o polímero nativo.

Destaca-se ainda que modificações químicas possam alterar as propriedades físico-químicas de polímeros em solução. Desta maneira, as ulvanas nativas e modificadas quimicamente foram avaliadas quanto a sua distribuição da massa molar pela técnica de HPSEC-RI-MALLS. Para tanto, foram utilizadas as ulvanas nativas (F2), modificadas por sulfatação (F2-S) e modificadas por oxidação, redução e sulfatação (P1r-S, P2r-S e P3r-S).

### 4.7.1 Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alto Desempenho (HPSEC-RI-MALLS)

A determinação da massa molar das ulvanas nativas e de seus produtos modificados quimicamente foi realizada através da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho acoplada a um detector de índice de refração e de espalhamento de luz. O perfil de eluição das frações F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S estão representados na figura 34 e os valores de massa molar e  $dn/dc$  na tabela 16.

As ulvanas nativas presentes em F2 apresentaram no RI um perfil unimodal. O  $M_w$  determinado para esta fração foi de  $110,6 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ . Para as demais frações, foi observado que estas eluem em um tempo maior quando comparado com F2, sugerindo que as modificações químicas realizadas induzem a despolimerização. As frações P1r-S – P3r-S apresentaram perfil unimodal, enquanto que para F2-S é possível observar a presença de duas populações, sugerindo, portanto, que F2-S é mais polidispersa em relação aos demais produtos modificados. O  $M_w$  para F2-S, P1r-S, P2r-S e P3r-S foi de 45,0, 41,1 e  $37 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ , respectivamente.

FIGURA 34 – GRÁFICO DO PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

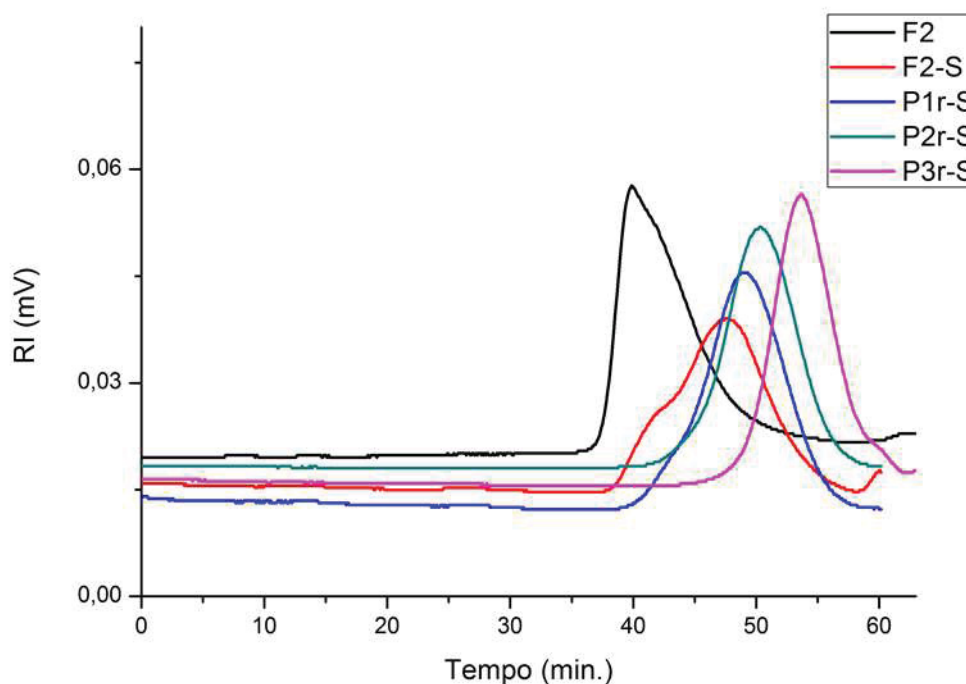


TABELA 16 - MASSA MOLAR MÉDIA PONDERADA E DN/DC DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE

Fração	$M_w \times 10^3 \text{ (g.mol}^{-1}\text{)}$	$dn/dc \text{ (mL.g}^{-1}\text{)}$
<b>F2</b>	110,6	0,118
<b>F2-S</b>	54,6	0,115
<b>P1r-S</b>	31,4	0,116
<b>P2r-S</b>	24,2	0,110
<b>P3r-S</b>	18,1	0,110

Portanto, estes dados mostram que tanto a sulfatação quanto a via de modificação química sequencial oxidação-redução-sulfatação provocam uma diminuição na massa molar das ulvanas. Essa diminuição da massa molar pode ser decorrente ao caráter ácido do reagente sulfatante o que ocasionaria um perda de massa devido a hidrólise do polímero. (MESTECHIKINA; SHCHERBUKHIN, 2009).

#### 4.8 ANÁLISES DE DICROÍSMO CIRCULAR

Grupos sulfato e carboxila conferem um caráter aniônico para os polímeros, o qual tem sido correlacionado com a atividade anticoagulante desempenhada por estas moléculas. Sendo assim, a presença destes grupos em polissacarídeos é essencial para a sua interação com proteínas da cascata de coagulação. No entanto, essa interação não depende apenas da composição química do polissacarídeo, mas também da conformação que estes polímeros adotam em solução. Dentro deste contexto, tem sido descrito que transições de conformação aleatória para conformação ordenada permitiriam um posicionamento adequado de grupos com cargas negativas dentro do sítio de ligação da proteína, favorecendo assim a interação (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

Desta maneira no presente trabalho, foi utilizada a técnica de dicróismo circular (CD) com o objetivo de fornecer informações referentes a conformação das frações nativa (F2), sulfatada (F2-S) e oxidadas-reduzidas-sulfatadas (P1r-S, P2r-S e P3r-S) em solução salina (0,9 % de NaCl), na temperatura de 37°C, sendo esta condição, a utilizada nos testes de atividade anticoagulante.

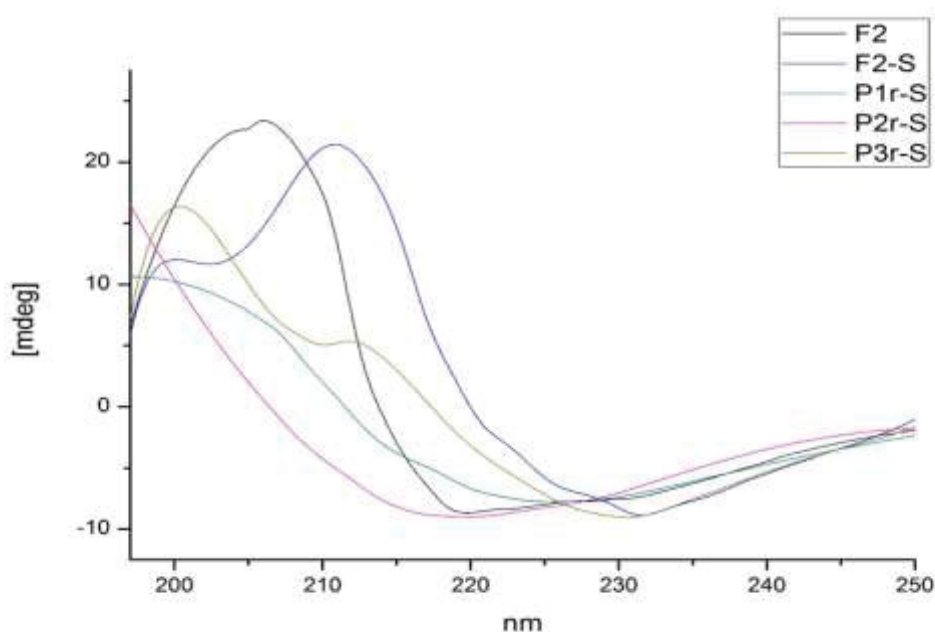
A figura 35 mostra as curvas obtidas após varredura (197-250 nm) das frações nativa (F2), sulfatada (F2-S) e oxidadas-reduzidas-sulfatadas (P1r-S, P2r-S e P3r-S). A fração F2 apresenta uma banda negativa em 220 nm e uma banda positiva em 202 nm com ponto de inversão em 216 nm. Este resultado sugere uma conformação em  $\alpha$ -hélice similar ao observado em soluções xantanas comerciais, a qual apresentava uma banda positiva em 202 e uma banda negativa em 220 nm (BUENO; PETRI, 2014).

A fração F2-S apresentou duas bandas positivas em 200 e 210 nm e uma negativa em 230 nm, com ponto de inversão em 220 nm. A presença de uma banda positiva faixa de 205 e 190 nm e negativa na faixa de 210 e 220 nm é característica de conformação de folha  $\beta$  (Côrrea; Ramos, 2009). Portanto esses resultados sugerem que a cadeia polimérica da fração F2-S é composta por segmentos de diferentes conformações, podendo ser estes hélice ou folha beta. Esta mudança conformacional pode ser atribuída a introdução dos grupos sulfato, uma vez que a repulsão eletrostática provocada pela carga negativa pode induzir uma mudança quanto a disposição (equatorial ou axial) deste grupos, acarretando em uma

transformação na conformação do polissacarídeo (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

Dentre as frações oxidadas-reduzidas-sulfatadas, P1r-S e P2r-S apresentaram uma banda negativa em 230 nm sugerindo uma conformação aleatória. Essa conformação aleatória foi atribuída a ruptura do anel provocada pela oxidação com periodato. Já a fração P3r-S apresentou perfil semelhante a fração F2-S, com duas bandas positivas em 200 e 210 nm e uma banda negativa em 230 nm (ponto de inversão em 215 nm). Desta maneira, P3r-S é composta, provavelmente, por segmentos tanto em hélice quanto em folha beta, apresentando assim, uma estrutura mais rígida quando comparada com P1r-S e P2r-S. Essa rigidez poderia estar relacionada a presença de hemiacetais detectados nas análises de RMN desta fração.

FIGURA 35 - VARREDURAS (197 – 250 nm) DO ESPECTRO DE CD EM NaCl 0,9% A 37°C



Através das análises de dicroísmo circular foi possível observar mudanças conformacionais relacionadas com a inserção de grupos sulfato e ruptura do anel provocada pela oxidação com periodato. Estas diferentes conformações podem ocasionar alterações na atividade biológica desempenhada por estes polímeros devido ao aumento ou diminuição da rigidez da cadeia polissacarídica. O aumento da rigidez não permitiria que transições de conformação aleatória para conformação ordenada ocorressem, levando assim a um posicionamento de cargas negativas do



polímero que não favoreceriam a interação das cargas negativas dentro do sítio de ligação da proteína, dificultando assim a interação. Já por outro lado a diminuição da rigidez da cadeia polissacarídica permitiria maior interação entre as cargas negativas do polímero com as cargas positivas da proteína aumentando a interação com as proteínas e consequente aumento da atividade biológica. (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Modificações químicas inéditas de ulvanas de *Ulva fasciata* foram realizadas via oxidação com *m*-periodato, redução e sulfatação.
- ✓ Outra modificação realizada com sucesso foi a sulfatação da ulvana nativa.
- ✓ Os derivados foram caracterizados química e espectroscopicamente.
- ✓ Os produtos modificados apresentaram atividade anticoagulante potencializada em relação ao polissacarídeo de origem.
- ✓ A atividade anticoagulante foi relacionada com o teor de grupos sulfato, massa molar e conformação.
- ✓ Desta forma os derivados modificados obtidos de ulvanas de *Ulva fasciata* são compostos bioativos com potencial aplicação como novos agentes anticoagulantes e/ou antitrombóticos.

## 6 REFERÊNCIAS

ALEKSEEVA A, CASU B, CASSINELLI G, GUERRINI M, TORRI G, NAGGI A. Structural features of glycol-split low-molecular-weight heparins and their heparin lyase generated fragments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 2013;406(1):249-65.

ALVES, A., SOUSA, R.A.; REIS, R.L. A practical perspective on ulvan extracted from green algae **Journal of Applied Phycology** (2013) 25: 407.

ARLOV, Ø.; AACHMANN, F. L.; FEYZI, E.; SUNDAN, A.; SKJÅK-BRÆK, G. The Impact of Chain Length and Flexibility in the Interaction between Sulfated Alginates and HGF and FGF-2. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 11, p. 3417–3424, 2015.

ARLOV, Ø.; AACHMANN, F. L.; SUNDAN, A.; ESPEVIK, T.; SKJÅK-BRÆK, G. Heparin-like properties of sulfated alginates with defined sequences and sulfation degrees. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 7, p. 2744–2750, 2014.

BAHL, O. P.; HULLAR, T. L.; SMITH, F. Reduction of the Products of Periodate Oxidation of Carbohydrates. XIII. Determination of Sugars in Polysaccharides Oxidized by Periodate<sup>1</sup>. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 1076–1078, 1964. American Chemical Society. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jo01028a020>>. .

BOUHADIR, K. H.; LEE, K. Y.; ALSBERG, E.; et al. Degradation of Partially Oxidized Alginate and Its Potential Application for Tissue Engineering. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 5, p. 945–950, 2001.

BRADING, J.W.E.; GEORG-PLANT, M.M.T.; HARDY, D.M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **Journal of the Chemical Society**, p. 319-324, 1954.

CAPUTO, H. E.; STRAUB, J. E.; GRINSTAFF, M. W. Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 8, p. 2338–2365, 2019. Royal Society of Chemistry.

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research**, v. 403 p. 60 - 68, 2015.

CARVALHO, M. M. Oxidação via periodato/clorito de ulvanas de ulva fasciata: atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

CARVALHO, M. M.; DE FREITAS, R. A.; DUCATTI, D. R. B.; et al. Modification of ulvans via periodate-chlorite oxidation: Chemical characterization and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 631–640, 2018..

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; AND CEREZO, A.S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of Green Seaweeds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2503-2529, 2010

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CHENG, H. L.; LIU, H.; FENG, Q. H.; XIE, Y. M.; ZHAN, H. Y. Preparation, characterization and in vitro anticoagulant activity of corn stover xylan sulfates. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 3, p. 271–283, 2017.

COSTE, O.; MALTA, E.; LÓPEZ, J.C.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Production of sulfated oligosaccharides from the seaweed *Ulva sp.* using a new ulvan-degrading enzymatic bacterial crude extract. **Algal Research**, v.10 p. 224–231, 2015

DANTAS, P.; SOUSA, F. DE. Estudo da cascata de coagulação sangüínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.2, p.49-55, 2007.

DAUS, S; PETZOLD-WELCKE,K; KÖTTERITZSCH, M. Homogeneous sulfation of xylan from different sources. **Macromolecular Materials and Engineering**, 296: 551-561. 2011.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. **Science**, 145(3638), 1310–1312. 1964.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochemical Journal**., v. 84, p. 106-110, 1962.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**., v. 28, p. 350-356, 1956.

FAGGIO, C.; PAGANO, M.; DOTTORE, A.; GENOVESE, G.; MORABITO, M. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides. **Natural Product Research**., v.30, n.17, p.1934-1937, 2016.

FASMAN, D. G. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. 1996.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry** v. 197, p. 157-162, 1991.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Simpósio: Hemostasia e trombose. Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229 - 237, jul./dez. 2001.

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.

GIACOMELLI, F. Tópicos em nanociência e nanotecnologia. Porto Alegre: **Editora da UFRGS**, v. 1, p. 93-106, 2008.

GLASSON, C.; SIMS, I.; CARNACHAN, S.; NYSA, R.; MAGNUSSON, M. A cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi*. **Algal Research**. 2017.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods carbohydrate chemistry**, Academic Press, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.

GRACHER, A. H. P.; SANTANA, A. G.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. A procoagulant chemically sulfated mannan. **Carbohydrate Polymers**, v.136, p.177–186, 2016.

GROMBE, R.; GOUZY, M. F.; FREUDENBERG, U.; POMPE, T.; ZSCHOCHE, S.; F. SIMON, F.; EICHHORN, K.-J.; JANKE, A.; VOIT, B.; WERNER, C. Sulfated cellulose thin films with antithrombin affinity . **Express Polymer Letters** Vol.3, No.11 p.733–742, 2009.

GOMEZ, G.; RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 296 – 304, 2007.

HAQ, Q. N.; PERCIVAL, E. In *Some Contemporary Studies in Marine Science*; Barnes, H., Ed.; Allen and Unwin Ltd.: London, p. 355-368, 1966.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. HEMATOLOGY / ONCOLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA Coagulation 2006 : A Modern View of Hemostasis. , v. 21, p. 1–11, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L.; et al. Hemostasis. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, p. 287–330, 2008. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123704917000106>>. Acesso em: 22/1/2019.

KRISTIANSEN, K.A; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research** v. 345, p. 1264–1271, 2010

KHOLIYA, F.; CHAUDHARY, J. P.; VADODARIYA, N., MEENA, R. Synthesis of bio-based aldehyde from seaweed polysaccharide and its interaction with bovine serum albumin. **Carbohydrate Polymers**. v.150 p. 278–285, 2016.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, v. 304, p. 325-333, 1997.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterization of oligosaccharides from two *Ulva rigida* samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydrate Research**, v. 314, p. 1-12, 1998.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p 239-249, 1998.

LAHAYE, M.; Robic, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v.8, n.6, p.1766-1774, 2007

LI, W., JIANG, N., LI, B., WAN, M., CHANG, X., LIU, H., LIU, S. Antioxidant activity of purified ulvan in hyperlipidemic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, 113, 971–975, 2018

LIU, X.; WANG, S.; CAO, S.; et al. Structural Characteristics and Anticoagulant Property In Vitro and In Vivo of a Seaweed Sulfated Rhamnan. **Marine drugs**, v. 143, n.16, 2018.

LOPES, N.; RAY, S.; ESPADA, S. F.; ANDRADE BOMFIM, W.A.; RAY, B.; FACCIN-GALHARDI L. C.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Green seaweed enteromorpha



compressa (*chlorophyta, ulvaceae*) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex vírus. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.102, p. 605–612, 2017.

LORENZI, T. F. Manual de hematologia: propedêutica e clinica. 4.ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374–381, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**., v. 193, p. 265-275, 1951.

MA,L.; CHENG, C.; NIE,C.; HE, C.; DENG,J.; WANG, L.; XIA, Y.; ZHAO, C. Anticoagulant sodium alginate sulfates and their mussel-inspired heparin-mimetic coatings. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 3203-3215, 2016.

MAO, M.; ZANG, X.; LI, Y.; ZHANG, H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. **Journal of Applied Phycology** v. 18, p. 9–14, 2016.

McKINNELL, J.P.; PERCIVAL, E. The acid polysaccharide from the green seaweed *Ulva lactuca*. **Journal of the Chemical Society**., p. 398-399, 1962b.

MCMILLAN E.;, ROBERTS M.;, DOCTOR V.M. .Effect of in-vitro addition of sulfated xylans, glucosans or chondroitins on the prothrombin time of human plasma and on the enhancement of activation of glutamic plasminogen by tissue plasminogen activator. **Blood Coagulation and Fibrinolysis** v. 22, n.3, p. 221-226. 2011.

MCREYNOLDS, K. D.; GERVAY-HAGUE, J. Examining the secondary structures of unnatural peptides and carbohydrate-based compounds utilizing circular dichroism. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 11, n. 2, p. 337–362, 2000.

MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R. G.; OLIVEIRA F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARAES, L. A.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Sulfated galactofucan from lobophora variegata: anticoagulant and antiinflammatory properties. **Biochemistry (Moscow)**, v.73, n. 9, p. 1018-1024, 2008

MELO, F.R., PEREIRA, M.S., FOGUEL, D., MOURAO, P.A.S. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulphated polysaccharides, **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 279, No. 20, p. 20824–20835, 2004.

MESTECHKINA, N.M.; SHCHERBUKHIN, V.D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46 ,p. 267-273, 2010

MOUSA, SHAKER A ET AL. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. **Thrombosis and haemostasis** vol. 96,6 (2006): 816-21.

MOURÃO P.A.S. Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. **Marine Drugs** v.13, p. 2770-2784, 2015.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZAFERRATO, L.; LIQUORI, A. M. Physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, n.4, p.309-315, 1999.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Biochemical Journal**, v. 86, p. 1323-1329, 1979.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminaran. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

PAWAR, S. N. Chemical Modification of Alginate. **Seaweed Polysaccharides**, p. 111–155, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098165000086>>. Acesso em: 11/1/2019.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**, v.48 p.543–549, 2003.

PEREIRA, M.S.; MULLOY B.; MOURÃO P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **Journal Biological Chemistry** v. 274: 7656–7667, 1999.

PEREIRA, M.S., MELO, F.R., MOURAO, P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans. **Glycobiology**, Vol.12, No. 10, p. 573-580, 2002.

QI, H.; SHENG, J. The antihyperlipidemic mechanism of high sulfate content ulvan in rats. **Marine Drugs**, v. 13, p. 3407-3421, 2015.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 179–188, 1997.

ROBIC, A.; SASSI, J.-F.; LAHAYE, M. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. **Carbohydrate Polymers**. v.74, p.344–352, 2008.

ROBIC, A.; GAILLARD, C; SASSI, J.-F.; LERAT, Y.; LAHAYE M. Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. **Biopolymers** v.91, n.8, p. 652-664, 2009.

SASISEKHARAN, R; SHRIVER Z. From crisis to opportunity: A perspective on the heparin crisis. **Thrombosis and Haemostasis**, v.102, p. 854–858, 2009.

SCHLESINGER, M.; SCHMITZ, P.; ZEISIG, R.; NAGGI, A.; TORRI, G.; CASU, B.; BENDAS, G. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. **Thrombosis Research**, v. 129, p. 603 – 610, 2012

SCOTT, J. E.; PAGE THOMAS, D. P. Spectrofluorimetric detection and measurement of hydroxyl radicals in periodate solution. **Carbohydrate Research**, 52(1), 214–218. 1976.

SHONIMA, G.M.; JIJI T.; PRATHEESH, P. T.; G MURALEEDHARA, K.G. Ex vivo anticoagulant activity of the polysaccharide isolated from ulva fasciata. **Int. International Journal of Life science and Pharma Research**, v.1, n. 3 p. 194-197, 2012.

SOUSA, E. T. D. E. coagulação sanguínea e modelos de sinalização : uma revisão de literatura blood coagulation and signal models : a literature review. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research** , v. 11, p. 20–23, 2015.

SYNYTSY, A.; et al. Structural Features and Anti-coagulant Activity of the Sulphated Polysaccharide SPS-CF from a Green Alga Capsosiphon fulvescens. **Marine Biotechnologic** ,v. 17, p. 718–735, 2015.

TABARSA, M.; YOU, S.; HASHEM, E. ScienceDirect Water-soluble polysaccharides from Ulva intestinalis: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1–10, 2017.

TABARSA, M.; YOU, S., DABAGHIAN, H. S. Water-soluble polysaccharides from Ulva intestinalis: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities, **Journal of Food and Drug Analysis**. 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.016>.

THANH, T.T.T.; QUACHA, T. M. T.; NGUYENB, T. N.; LUONGA, D. V.; BUIC,M. L.; TRAN T. T. V. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from greenseaweed *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 695–702, 2016.

VENKATESAN, J.; NITHYA, R.; SUDHA, P. N. Role of Alginate in Bone Tissue Engineering. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 73, p. 45–57, 2014.

VERRASTRO, THEREZINHA; LORENZI, TEREZINHA FERREIRA; NETO, S. W. Hematologia e Hemoterapia - Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2005.

VOLD, I. M. N.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. **Carbohydrate Research**, 340, 679–684. 2005.

ZHANG, H.; WANG, J.-Q.; NIE, S.-P.; et al. Sulfated modification, characterization and property of a water-insoluble polysaccharide from *Ganoderma atrum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 248–255, 2015.

ZHANG, L.; HUANHUAN GE, H.; . XU, M. . CAO, J.; DAÍ, Y. Physicochemical properties, antioxidant and antibacterial activities of dialdehyde microcrystalline cellulose. **Cellulose** v.24, p.2287–2298, 2017.

YAICH, H.; AMIRA, A.M.; ABBESA, F.; BOUAZIZ,M.; BESBES, S.; RICHELD, A.; BLECKER, C.; ATTIA,H.; GARNA, H. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *ulva lactuca* collected in monastir coast. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2017.

YORK, M. J. Clinical Pathology. A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical **Drug Development**, p. 167–211, 2013. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123878151000083>>. Acesso em: 22/1/2019.

WHISTLER, R. L. Solubility of Polysaccharides and Their Behavior in Solution. **Advances in Chemistry**, 242–255.1973.